

Lya Piaia

**Incorporação de *Aloe vera* em membranas de celulose bacteriana  
afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti

Florianópolis, SC  
Setembro, 2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Piaia, Lya

Incorporação de Aloe vera em membranas de celulose bacteriana afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos / Lya Piaia ; orientador, Luismar Marques Porto ; coorientador, Fernanda Vieira Berti. - Florianópolis, SC, 2014.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. cellulose bacteriana . 3. Aloe vera. 4. fibroblastos. 5. queratinócitos. I. Marques Porto, Luismar . II. Vieira Berti, Fernanda. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Lya Piaia

**Incorporação de *Aloe vera* em membranas de celulose bacteriana afeta a proliferação de fibroblastos e queratinócitos**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 30 de setembro de 2014.

---

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Química

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Presidente  
UFSC

---

Dr.<sup>a</sup> Andréa de Lima Pimenta  
Membro colaborador  
PósENQ/UFSC

---

Prof. Dr. Júlio C. M. Souza  
Membro Externo  
UFSC/CEPID

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira  
Membro Interno  
UFSC/EQA

Este trabalho é dedicado à minha Mãe Ilhete e à minha Tia Inelve pelo apoio e amor incondicional; pela luz e coragem de meus avós (em memória): Santo Piaia e Mafalda Bernardi Piaia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pelas bênçãos.

Ao professor Dr. Luismar Marques Porto, pela confiança em ter me aceito na sua equipe, pela orientação, ensinamentos, pela compreensão, incentivo e amizade.

À Dr.<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti, pela coorientação, pela força, pelo incentivo, pela dedicação, colaboração, pelas palavras de apoio nas horas mais complicadas e pela amizade.

À banca examinadora: Dr.<sup>a</sup> Andréa de Lima Pimenta, Prof. Dr. Júlio C. M. Souza e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Débora de Oliveira pelas sugestões para aprimorar o meu trabalho.

À minha mãe Ilhete e minha tia Inelve, pela dedicação, coragem e pelo incentivo de nunca desistir. Sou fruto da boa educação que elas deram, juntamente com o vô Santo e a vó Mafalda. Vocês são o meu orgulho e por vocês “moverei” até montanhas.

Aos meus tios e tias, primos e primas mesmo com a distância emanavam boas vibrações e pensamentos positivos.

À minha amiga e colega Camila Q. P. Paes, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela calma, força e amizade.

À minha “irmã”, amiga e colega Samara, pelas palavras, pelos ensinamentos, pelas horas de alegria e cumplicidade. Você foi essencial nessa jornada!

Às minhas “plenas”, minhas amigas e colegas, Julia e Camila Schroeder: pelo ombro amigo, pelas alegrias, pelas horas maravilhosas que só passei ao lado de vocês aqui na ilha.

À minha amiga e cúmplice, Adrieli Dal’Toé, pela companhia, pela força, pelos ensinamentos, pela amizade, pelo incentivo de sempre continuar e por estar presente todo o tempo. Você também foi essencial nessa jornada.

Às “anjinhas” que iluminaram minha vida, presentes de Deus.

Às minhas amigas de infância, que levo comigo para sempre: Mírian, Jamile, Caroline e Renata, obrigada pela amizade de anos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, pela companhia e ensinamentos: Guilherme e Ericka que estiveram desde o início desta jornada; aos que foram chegando e partindo ao longo dos meses: Charles, Afonso, Karina, Drielle, Maikon, Emily, Américo, Giovana, Renata, Isla, Alencar, Renata, Joanna, Andréa, Taísa, Edroaldo; e todos os alunos de iniciação científica que estiveram no Intelab no período de 2012-2014.

Aos meus amigos de longe pelo incentivo e pelas boas vibrações.

Aos amigos de perto pelas palavras de conforto e sinceridade, além dos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos – EQA/UFSC.

Aos laboratórios: Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT/UFMG), Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Compósitos (Policon/UFSC), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB 1/UFSC), e ao Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (UFSC). Agradeço o auxílio com materiais, reagentes e equipamentos.

Ao CNPq, CAPES e FINEP, pelo suporte financeiro.

Todas as pessoas que passaram pela minha vida nesses anos do mestrado, sem esquecer (é claro!) dos amores e das paixões (risos) Agradeço o carinho e os ensinamentos.

Sou mais forte por ter vivido tudo com muita intensidade perto de vocês.

“Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você  
queira ir. Seja o que você quer ser, porque você  
possui apenas uma vida e nela só temos uma chance  
de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade  
bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la  
forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança  
suficiente para fazê-la feliz.”

Clarice Lispector





## RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um polímero produzido por diversas bactérias, entre elas a bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. Este polímero apresenta-se como uma rede de nanofibras com propriedades físico-químicas peculiares, o que o possibilita a ser utilizado como biomaterial em diversas áreas. Este biomaterial pode ter o seu espectro de aplicação ainda mais ampliado quando produzido com a incorporação de frações de extratos naturais. A *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) é uma planta que apresenta propriedades terapêuticas e medicinais utilizadas há milhares de anos. Ela possui polissacarídeos em sua composição que atuam fortemente na regeneração e reparo de tecidos lesionados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento das células de fibroblasto e queratinócito quando cultivadas na superfície mais porosa de membranas de CB pura e membranas de CB com incorporação de frações de *Aloe vera* (CB-Aloe), na perspectiva de se desenvolver futuramente um biomaterial que atue como substituto de pele humana. Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou-se que a incorporação de *Aloe vera* nas membranas CB não alterou a estrutura da rede nanofibras de CB pura. A análise por espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) identificou diferenças referentes aos grupos amino existentes nas frações de *Aloe vera*, bem como a presença de anéis piranosídicos, tais como de  $\beta$ -D-manose e de  $\beta$ -D-glicose. Foi possível identificar que células epiteliais quando cultivadas sobre a superfície porosa das membranas de CB com incorporação de duas frações específicas de *Aloe vera* (CB-G e CB-T) apresentaram atividade metabólica e proliferação celular mais expressiva do que as demais membranas estudadas. A biossíntese de colágeno por fibroblastos foi significativamente aumentada nas membranas de CB-Aloe quando comparada com a CB pura. A análise morfológica por MEV de células cultivadas sobre as membranas modificadas (CB-Aloe) mostraram que células epiteliais aderiram em todas as membranas, mas só foi observada que células cultivadas em CB pura e em CB com a incorporação de uma fração específica de *Aloe vera* (CB-F), estavam espalhadas indicando um efeito positivo dessa fração de *Aloe vera* na adesão celular.

**Palavras-chaves:** celulose bacteriana, *Aloe vera*, fibroblastos, queratinócitos.



## ABSTRACT

Incorporation of *Aloe vera* in bacterial cellulose membranes affects the proliferation of fibroblasts and keratinocytes

Bacterial cellulose (BC) is a polymer produced by various bacteria, including the bacterium of the *Gluconacetobacter* genre. It is synthesized as a network of nanofibers with particular physicochemical properties, which make it a suitable biomaterial for the use in a variety of fields. The range of application of this biomaterial can be further expanded by the incorporation of natural extracts with biological activities. *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) is a plant with well-documented medicinal and therapeutic properties, particularly active in regeneration and repair of injured tissues, mainly due to its particular polysaccharide composition. The objective of this study was to evaluate the behavior of keratinocyte and fibroblast cells when grown on the porous surface of pure BC membranes or on BC membranes incorporated with *Aloe vera* fractions (BC-Aloe), in view of the development of a biomaterial that could be used as human skin substitute. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis showed that the incorporation of *Aloe vera* into the BC nanofibers did not alter the original structure of the fiber network. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) analysis identified differences in amino groups present in the membranes with or without *Aloe vera*, as well as the presence of pyranoside rings, such as  $\beta$ -D-mannose and  $\beta$ -D-glucose specifically in the BC-Aloe membranes. Metabolic activity and cell proliferation were more expressive when epithelial cells were cultured over the porous surface of BC membranes incorporated with two specific *Aloe vera* fractions (BC-T and BC-G). Biosynthesis of collagen was increased in fibroblasts cultivated on BC-Aloe membranes when compared to those cultivated on pure BC membranes. Morphological SEM analysis of cells cultivated over the modified membranes showed that epithelial cells adhered to all membranes, but spreading was only observed for cells grown on pure BC or BC incorporated with one specific *Aloe vera* fraction (BC-F), indicating a positive effect of this *Aloe vera* fraction on the cellular adhesion of the biomaterial.

**Keywords:** bacterial cellulose, *Aloe vera*, fibroblasts, keratinocytes.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da pele com suas camadas e anexos.....	29
Figura 2. Esquema ilustrativo das frações de <i>Aloe vera</i> e membranas com a incorporação de frações de <i>Aloe vera</i> (CB-Aloe). ....	37
Figura 3. Membrana de CB após 10 dias de cultivo, após purificação (remoção de bactérias e resíduos) com NaOH.....	39
Figura 4. Fibroblastos primários de derme humana (HDFa) em processo de propagação celular. (Microscopia óptica, aumento de 5×). ....	41
Figura 5. Queratinócitos (HaCaT) em processo de propagação celular. (Microscopia óptica, aumento de 5×). ....	41
Figura 6. Micrografia das membranas CB e CB-Aloe obtidas por MEV. As membranas CB-Aloe foram produzidas com a adição de 60% de frações de <i>Aloe vera</i> . A ampliação utilizada para obtenção das micrografias foi de 3000×.....	47
Figura 7. <b>a)</b> Espectro de FTIR-ATR das membranas desidratadas de (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F, na janela espectral entre os picos correspondentes de 4000 a 600 $\text{cm}^{-1}$ . <b>b)</b> Espectro de FTIR-ATR das membranas desidratadas de (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F, com janela espectral entre os picos correspondentes de 2000a 600 $\text{cm}^{-1}$ .....	48
Figura 8. Massa das membranas de celulose bacteriana pura e com a incorporação de frações de <i>Aloe vera</i> após serem liofilizadas. Os dados foram normalizados em relação à CB pura. As barras representam o desvio padrão médio e * representa as diferenças significativas para $p < 0,05$ entre a CB e CB-Aloe. ....	50
Figura 9. Atividade metabólica de HDFa cultivadas sobre membranas de CB e CB-Aloe durante 1, 3 e 7 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Os ensaios foram realizados em quadruplicatas para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e * representa as diferenças significativas para $p < 0,05$ entre a CB e CB-Aloe. ....	52
Figura 10. Viabilidade celular das HDFa, analisadas por microscopia de fluorescência, pelo do kit <i>Live/Dead®</i> . As células vivas estão coradas em verde (calceína) e células mortas estão coradas em vermelho (homodímero de etídio). ....	53
Figura 11. Proliferação celular de fibroblastos cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe.Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e * representa as diferenças significativas para $p < 0,05$ entre a CB e CB-Aloe.....	54
Figura 12. Atividade metabólica de queratinócitos HaCat cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe durante 1, 3 e 7 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e * representa as diferenças significativas para $p < 0,05$ entre a CB e CB-Aloe. ....	56
Figura 13.Viabilidade celular das HaCat, analisadas por microscopia de fluorescência, pelo do kit <i>Live/Dead®</i> . As células vivas estão coradas em verde	

(calceína) e células mortas estão coradas em vermelho (homodímero de etídio).	
.....	57
Figura 14. Proliferação celular de HaCat cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e * representa as diferenças significativas para $p < 0,05$ entre a CB e CB-Aloe.....	58
Figura 15. Micrografias obtidas por MEV de membranas de CB (a), CB-G (b), CB-T (c) e CB-F (d) mostrando fibroblastos cultivados por 24 horas, aderidos à superfície das membranas. ....	60
Figura 16. Morfologia de fibroblastos cultivados sobre as membranas (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F. Os filamentos de F-actina que compõem o citoesqueleto das células HDFa aparecem corados por faloidina (vermelho) e os núcleos por DAPI (azul). ....	61
Figura 17. Micrografias obtidas por MEV de membranas de CB (a), CB-G (b), CB-T (c) e CB-F (d) mostrando queratinócitos cultivados por 24 horas, aderidos à superfície das membranas. ....	62
Figura 18. Morfologia de queratinócitos cultivados sobre as membranas (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F. Os filamentos de F-actina que compõem o citoesqueleto das células HaCat aparecem corados por faloidina (vermelho) e os núcleos por DAPI (azul). ....	63
Figura 19. Quantificação da biossíntese de colágeno por fibroblastos cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe. Dados normalizados em relação à CB controle. As barras representam o desvio padrão médios e * representa as diferenças significância para $p < 0,05$ . ....	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1.	OBJETIVOS.....	27
1.1.1	Objetivo geral.....	27
1.1.2	Objetivos específicos .....	27
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>29</b>
2.1.	A PELE HUMANA.....	29
2.1.1	Camadas de pele.....	30
2.1.2	Injúrias de pele.....	30
2.1.3	Processo de regeneração da pele.....	31
2.2.	BIOMATERIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS .....	32
2.3.	ENGENHARIA TECIDUAL DE PELE HUMANA .....	33
2.3.1	Breve histórico.....	33
2.3.2	Celulose bacteriana com incorporação de biomoléculas ...	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE. ....	37
3.1.1	<b>Produção, purificação e esterilização das membranas .....</b>	<b>38</b>
3.1.1.1	Produção de membranas de celulose bacteriana (CB).....	38
3.1.1.2	Produção de membranas de celulose bacteriana com a incorporação de frações de <i>Aloe vera</i> (CB-Aloe).....	38
3.1.1.3	Purificação e esterilização das membranas CB e CB-Aloe.....	39
3.2.	ANÁLISE DA TOPOLOGIA DE SUPERFÍCIE POR MEV E FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR-ATR DAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE.....	39
3.2.1	Secagem das membranas por liofilização .....	39
3.2.2	Análise das membranas de CB e CB-Aloe por FTIR-ATR	40
3.2.3	Análise das membranas de CB e CB-Aloe por MEV.....	40
3.2.4	Quantificação da massa seca das membranas CB e CB-Aloe.....	40

3.3.	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....	40
3.3.1	Culturas de células epiteliais.....	40
3.3.2	Atividade metabólica celular .....	42
3.3.3	Proliferação celular .....	42
3.3.4	Avaliação de adesão e morfologia celular .....	43
3.3.4.1	Secagem das membranas por desidratação com soluções de etanol.....	43
3.3.4.2	Secagem por ponto crítico de CO <sub>2</sub> .....	43
3.3.4.3	Análise de adesão das células sobre as membranas de CB e CB-Aloe por MEV.....	43
3.3.4.4	Análise da morfologia das células sobre membranas de CB e CB-Aloe por faloidina e DAPI.....	44
3.3.5	Biossíntese de colágeno pelos fibroblastos (HDFa) .....	44
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1.	ANÁLISE DA TOPOLOGIA DE SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS POR MEV .....	47
4.2.	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR-ATR.....	48
4.3.	MASSA SECA DAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE .....	50
4.4.	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>in vitro</i> .....	51
4.4.1	Atividade metabólica fibroblastos primários (HDFa) .....	51
4.4.2	Proliferação de fibroblastos primários (HDFa) .....	54
4.4.3	Atividade metabólica de queratinócitos humanos (HaCat) .....	55
4.4.4	Proliferação de queratinócitos humanos (HaCat) .....	58
4.4.5	Adesão e morfologia de células epiteliais.....	59
4.4.5.1	Fibroblastos primários (HDFa).....	59
4.4.5.2	Queratinócitos humanos (HaCat).....	62
4.4.6	Biossíntese de colágeno pelos fibroblastos .....	65
5	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69



# 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano. Esse órgão é considerado como a primeira barreira de defesa do organismo. A pele desempenha ainda importantes funções como: homeostasia, regulação da temperatura corporal e proteção contra a desidratação, além de proporcionar apoio aos vasos sanguíneos e nervos (GARTNER, 2007; JUNQUEIRA, 2008; LIN *et al.*, 2013). Danos extensos e profundos da pele e mucosas podem causar a destruição da derme e epiderme. O dano de pele pode ser solucionado utilizando enxertos de pele humana, autóloga ou não. No entanto, essa solução é limitada pela escassez de doadores e com risco de rejeição do enxerto (SOUTO *et al.*, 2006; SOUTO *et al.*, 2009).

Biomateriais estão sendo produzidos e utilizados como substitutos teciduais, buscando proteger as lesões do ambiente circundante. Esses são produzidos com diferentes materiais, utilizando biomoléculas e compostos diversos, que auxiliam na regeneração e no reparo do tecido hospedeiro (SHEVCHENKO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Um substituto ideal deve apresentar algumas propriedades, dentre elas: prevenção às infecções secundárias, provimento de um microambiente de regeneração, isolamento térmico, possibilidade de remoção sem causar danos ao tecido em recuperação, ser livre de partículas tóxicas, entre outras (WITTAYA e PRAHSARN, 2006). O biomaterial deve servir como ‘guia’ para as células favorecendo a adesão, crescimento e diferenciação celular (ZHONG *et al.*, 2010).

A necessidade no desenvolvimento de substitutos temporários e/ou permanentes de tecido lesionado surge desse contexto. Uma abordagem para o desenvolvimento de substitutos de pele funcionais é produzir biomateriais tridimensionais, os quais se assemelham ao microambiente fisiológico em presença da matriz extracelular, quando cultivados com células epidérmicas humanas e com fibroblastos dérmicos humanos, promovendo o crescimento do tecido artificial (BELL *et al.*, 1983; TAKAKURA *et al.*, 1999; GRON *et al.*, 2002).

A celulose bacteriana apresenta-se como um *scaffold* promissor a ser utilizado em aplicações na área biomédica (PETERSEN e GATENHOLM, 2011; BERTI *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2013; COLLA, 2014; GODINHO, 2014). Em estudos relacionados ao reparo de pele, a celulose bacteriana apresentou propriedades relevantes, tais como: biocompatibilidade, elasticidade, transparência e capacidade de manter o ambiente úmido (SAXENA e BROWN, 2005; CZAJA *et al.*,

2006; RECOUVREUX, 2008; BERTI *et al.*, 2013; GODINHO, 2014), além de apresentar uma estrutura composta por nanofibras de celulose modulada em espessura e tamanhos ideais para cada tipo de aplicação (RAMBO *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2012).

Os curativos que estão sendo comercializados auxiliam a regeneração tecidual (KOIDE *et al.*, 1993; GENTZKOW *et al.*, 1996; SAYAG *et al.*, 1996; LORENZ *et al.*, 1997; HAFEMANN *et al.*, 1999; BADYLAK, 2007). Sendo que estes tratamentos apresentam custos elevados e muitas vezes não induzem a cura efetiva da lesão, enfatizando a necessidade de se investir no desenvolvimento de novos tratamentos e dispositivos que apresentam um melhor custo-benefício.

A *Aloe vera* tem sido utilizada na pesquisa terapêutica, por suas propriedades imunoreguladoras, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antivirais, entre outras. Ela apresenta polissacarídeos em sua composição, os quais estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno em lesões teciduais como em modelos de úlceras *in vivo* (CHITHRA *et al.*, 1998; RAMACHANDRA e RAO, 2008; SURJUSHE *et al.*, 2008).

Estudos realizados no Intelab/UFSC vêm sendo desenvolvidos para adequar as propriedades da celulose bacteriana para uso em engenharia de tecidos. A incorporação de agentes químicos e/ou biológicos nas etapas de produção deste biomaterial poderá aumentar o espectro de aplicação da celulose bacteriana, melhorando suas propriedades físico-químicas.

No nosso laboratório, GODINHO (2014) desenvolveu diferentes membranas incorporadas com 20%, 40%, 60% e 80% (v/v) de frações de *Aloe vera* em celulose bacteriana. GODINHO concluiu que as membranas produzidas com 60% (v/v) dessas frações são as que apresentaram melhores condições para adesão e a viabilidade celular, além de aumentar a interação célula/material (GODINHO, 2014).

O presente trabalho foi realizado em continuidade ao trabalho desenvolvido por GODINHO (2014), que tinha como intuito o desenvolvimento de novas alternativas eficazes para a reparação tecidual, utilizando o hidrogel de celulose bacteriana como biomaterial base. Foi utilizado nesse estudo membranas de celulose bacteriana e celulose bacteriana com a incorporação de frações de *Aloe vera* (Frações 60% v/v) (CB-Aloe). O lado mais poroso das membranas foi utilizado, pois apresenta um microambiente que se assemelha com o da matriz extracelular.

Células provenientes de pele humana (queratinócito e fibroblasto) foram testadas para análise da interação célula/biomaterial.

Também, analisou-se o efeito de incorporações de biomoléculas ativas de *Aloe vera* em hidrogéis de celulose bacteriana sobre o comportamento e interação de células epiteliais humanas cultivadas em sua superfície mais porosa.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab/UFSC), sendo que algumas análises foram realizadas com o auxílio dos laboratórios: Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Compósitos (Policon/UFSC) análise por FTIR-ATR; Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) análise por MEV, Laboratórios Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB 1/UFSC) leitura no espectrofotômetro fluorescente.

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Analisar o comportamento de células epiteliais cultivadas sobre membranas de celulose bacteriana e membranas de celulose bacteriana incorporadas com frações de *Aloe barbadensis* Miller, tendo como finalidade produzir membranas que possam atuar como substitutos de pele humana.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Caracterizar as interações físico-químicas nas membranas de celulose bacteriana (CB) incorporadas com frações de *Aloe vera* Miller (CB-Aloe);

Quantificar a atividade metabólica e proliferação de fibroblastos e queratinócitos humanos, a fim de verificar o comportamento das células epiteliais quando cultivadas sobre as membranas CB e CB-Aloe;

Investigar a adesão e morfologia celular de células epiteliais, cultivadas sobre as membranas de CB e CB-Aloe;

Quantificar o colágeno tipo 1 biossintetizado por fibroblastos, na presença de frações de *Aloe vera* incorporadas nas membranas de CB.



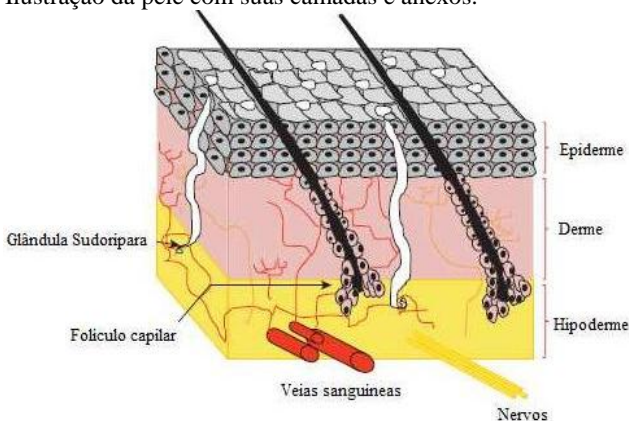
## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. A PELE HUMANA

A pele humana é um órgão que reveste o corpo na sua totalidade equivalendo a 16% do peso corporal. Protege o organismo das interações com o meio exterior (GARTNER, 2007; JUNQUEIRA, 2008). As funções ativas e passivas da pele são desempenhadas por células especializadas, as quais estão localizadas em duas camadas que possuem bordas irregulares, devido à sua distinta geometria (LANZA, 2007).

As camadas da pele estão compreendidas em: epiderme com múltiplas camadas de queratinócitos; a derme localizada logo abaixo da epiderme, e a terceira camada, a hipoderme, a qual compreende o tecido adiposo (SHEVCHENKO *et al.*, 2010; YILDIRIMER *et al.*, 2012). Possui ainda os anexos, que estão localizados junto à hipoderme, tais como: nervos, vasos sanguíneos, folículos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas, conforme mostradas na Figura 1.

Figura 1. Ilustração da pele com suas camadas e anexos.



Fonte: Adaptada de *Trends in Biotechnology* (YILDIRIMER *et al.*, 2012).

As primeiras camadas da pele protegem o organismo contra a perda de água por evaporação, atrito e microrganismos patogênicos e também possui propriedade termorreguladora promovida pelos vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo (JUNQUEIRA, 2008; PRIYA *et al.*, 2008). Contudo, uma vez a barreira violada, os mecanismos de

vigilância são ativados, desencadeando uma cascata de sinalização celular para limitar a dor no local da lesão e controlar eventuais infecções (YILDIRIMER *et al.*, 2012).

### **2.1.1 Camadas de pele**

A camada epidérmica tem renovação celular contínua, sendo esta designada como um epitélio estratificado e constituído vários tipos celulares, a maioria queratinócitos, derivados da camada ectodérmica, submetido a um processo de diferenciação morfológica e bioquímica regular, formando diferentes pavimentos celulares. Nesse processo de renovação celular a célula gerada migra em direção à superfície da pele num processo que chega a 30 dias (BOYCE e WARDEN, 2002; KANITAKIS, 2002).

A camada dérmica é compressível, sólida e o tecido conjuntivo protege a epiderme, consistindo em moléculas fibrosas e substâncias intracelulares. Essa camada é composta por diferentes tipos celulares destacando o fibroblasto (KANITAKIS, 2002). Este secreta colágeno, elastina e outras proteínas da MEC, assim como fatores solúveis responsáveis pelas sinalizações específicas entre as células vizinhas, tendo um papel biológico importante na regulação fisiológica da pele (LEE *et al.*, 2006).

A hipoderme, a qual compreende o tecido adiposo (SHEVCHENKO *et al.*, 2010; YILDIRIMER *et al.*, 2012) possui ainda os anexos, tais como: nervos, vasos sanguíneos, folículos capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas.

### **2.1.2 Injúrias de pele**

A pele pode sofrer danos como queimaduras, úlceras, cortes, entre outros. As queimaduras normalmente ocorrem por ação térmica, elétrica, química, radioativa, com focos específicos de lesão e profundidade (HETTIARATCHY e DZIEWULSKI, 2004). Estas lesões são classificadas conforme a incidência da ação, podendo ser de primeiro, segundo e terceiro grau (VALE, 2005).

De acordo com VALE (2005) queimaduras de primeiro grau têm ação apenas na primeira camada da pele, na epiderme, o que acarreta uma recuperação sem cicatrizes. Porém, a queimadura de segundo grau compromete a epiderme e a derme causando vermelhidão, edema e reparação mais lenta podendo deixar cicatrizes. No caso das queimaduras de terceiro grau a lesão é mais profunda, a qual atinge o

tecido adiposo e ósseo, neste caso enxertos são necessários para a recuperação da pele.

Úlceras ou feridas crônicas são lesões em que a epiderme ou parte superior da derme é destruída por pressão ou outras patologias. Uma vez que a úlcera se desenvolve, o ambiente da ferida crônica assume suas próprias características, as quais incluem expressão excessiva de proteases, aumento da senescência celular e a chance de invasão microbiana (ZAULYANOV, 2007).

Outra injúria da pele é o ferimento por corte, que induz uma cascata de sinalizações as quais estimulam a migração de plaquetas, que se encontram no sistema circulatório e se deslocam para o local do ferimento. As plaquetas aderem formando um trombo, a hemorragia é controlada (PALSSON, 2004). Em seguida, ocorre à migração das células inflamatórias e os macrófagos e neutrófilos agem em conjunto combatendo os microrganismos e/ou agentes invasores. Há migração de células endoteliais e fibroblásticas para o local da injúria, iniciando a reconstrução das camadas destruídas. A produção de colágeno e algumas integrinas remodelam a matriz, finalizando a cicatrização do ferimento (PALSSON, 2004; BALBINO *et al.*, 2005).

### **2.1.3 Processo de regeneração da pele**

O reparo da pele lesada envolve três fases: a homeostase do tecido, as células substitutas produzidas levam dias ou até anos para se reorganizarem estruturalmente. A fase intermediária na qual há proliferação de células, adesão e migração, remodelagem o ferimento; e a última etapa que é a reepitelização (PALSSON, 2004).

Na fase inicial da cicatrização de feridas, o reparo é temporário e ocorre através da deposição de coágulos de sangue induzindo uma resposta inflamatória inicial. Posteriormente, os fibroblastos irão se desenvolver para formar um novo tecido que terá interação com a derme a qual irá cobrir a superfície degenerada (PRIYA *et al.*, 2008).

No reparo do tecido lesionado ocorre a infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e a migração de células das áreas adjacentes, sendo estas células epiteliais, queratinócito e fibroblasto. Ao longo do processo ocorre a produção de colágeno pelos fibroblastos (fibroplasia), deposição de matriz extracelular, formação de novos vasos (angiogênese), cicatrização e reepitelização da região da ferida (SINGER e CLARK, 1999). O reparo completo da lesão é resultado de sucessivas reações anabólicas e catabólicas, sendo que os leucócitos são os principais protagonistas (PALSSON, 2004).

## 2.2. BIOMATERIAIS E ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos tornou-se uma área de pesquisa essencial para o entendimento da interação entre a célula e o biomaterial. Ela abrange princípios de biologia e engenharia, visando o desenvolvimento de substitutos funcionais para um tecido danificado (LANGER e VACANTI, 1993). A falta de interação biológica dos materiais atualmente utilizados como substitutos de tecidos no corpo humano tem fomentado a crescente demanda da pesquisa em engenharia de tecidos (STOCK e VACANTI, 2001).

Busca-se desenvolver biomateriais com propriedades químicas e biológicas que mimetizem microambientes dos tecidos nativos, os quais poderão induzir uma resposta de regeneração do tecido hospedeiro (PAMPALONI *et al.*, 2007; PÉREZ *et al.*, 2013).

A estrutura interna dos biomateriais deve reproduzir um ambiente instrutivo para as células, as quais irão conectar-se ao biomaterial, aderindo e proliferando sobre mesmo (PÉREZ *et al.*, 2013). As culturas celulares em *scaffolds* 3D têm a capacidade de imitar o ambiente *in vivo*, assemelhando-se ao microambiente fisiológico e à matriz extracelular (MEC) (KLEINMAN *et al.*, 1986; DUTTA e DUTTA, 2009; BOWERS *et al.*, 2010).

Uma classe de biomateriais promissora para cultura de células em ambiente 3D é a dos hidrogéis (DRURY e MOONEY, 2003; TIBBITT e ANSETH, 2009; KLEMM *et al.*, 2011; RECOUVREUX *et al.*, 2011). Eles apresentam uma rede de poros interligados permitindo a retenção de elevado teor de água e o transporte eficiente de oxigênio, nutrientes e produtos residuais (DRURY e MOONEY, 2003). Os *scaffolds* de celulose bacteriana (CB) já vêm provando serem adequados para a engenharia de tecidos, e estão sendo testados e utilizados para implantes de tecido duro como ossos e cartilagem (ANDERSSON *et al.*, 2010; KLEMM *et al.*, 2011).

A CB apresenta propriedades físicas e mecânicas não apresentadas por outro biomaterial. Além de apresenta excelente capacidade de se adequar a formas diferentes pode ser conjugada com outros materiais (BERTI *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2013; COLLA, 2014).



## 2.3. ENGENHARIA TECIDUAL DE PELE HUMANA

### 2.3.1 Breve histórico

Remetendo-se ao princípio do desenvolvimento da engenharia de tecidos pode-se identificar seu apogeu na década de 60. Sendo que nesta década foi iniciada a produção de dispositivos de pele, como os filmes poliméricos, que serviam para cobrir ferimentos ocasionados por queimaduras e demais injúrias (WALDER *et al.*, 1969).

Nas décadas de 70 e 80 o potencial da engenharia de tecidos utilizando biomateriais foi reconhecido (LEVIN *et al.*, 1979; BURKE *et al.*, 1981); a partir de 1980, vários produtos entraram no mercado. No caso de implantes para pele artificial, uma matriz para a regeneração da derme (Integra<sup>®</sup>, Alemanha) foi desenvolvida por Burke e Yanas, e a mesma foi autorizada à venda no ano de 1996; entretanto, só foi autorizada para o tratamento de queimados (GENTZKOW *et al.*, 1996; SAYAG *et al.*, 1996; LORENZ *et al.*, 1997). Em 1998, um dispositivo médico contendo células alogênicas foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) EUA, sendo utilizado para tratamento de úlceras venosas (ZAULYANOV, 2007).

O crescimento *in vitro* de células de fibroblastos e queratinócitos em hidrogéis desde a década de 80 tem sido utilizado para avaliar a diferenciação de queratinócitos (STOPAK e HARRIS, 1982; TOMASEK e HAY, 1984) e a sua aplicação na reconstrução da pele (SOUTO *et al.*, 2006).

No desenvolvimento de *scaffolds* algumas particularidades são fundamentais e devem ser avaliadas, por exemplo: biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, para que possam ser capazes de controlar a migração, proliferação e diferenciação e auto-organização celular (BOYCE e WARDEN, 2002; BIONDI *et al.*, 2008; GEORGE e RAVINDRAN, 2010) proporcionando funcionalidade biomecânica (GRIFFITH e NAUGHTON, 2002) ao dispositivo.

Os materiais estudados para aplicações na engenharia tecidual de pele são diversificados, como por exemplo: poly ( $\epsilon$ -caprolactona), quitosana, colágeno, gelatina, dentre outros (KOIDE *et al.*, 1993; HAFEMANN *et al.*, 1999; BADYLAK, 2007). Os *scaffolds* de colágeno apresentam propriedades semelhantes ao colágeno ativo, sendo que eles apresentam uma superfície adequada para adesão celular pela presença de glicoproteínas como a fibronectina (PURNA e BABU, 2000). Alguns biomateriais 3D como colágeno tipo I e gelatina são utilizados no cultivo celular de fibroblasto e queratinócito, células epiteliais as quais

auxiliam na estruturação das camadas da pele lesada (SCHAFER *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 2003). Os compostos de gelatina e  $\beta$ -glucana proporcionam suporte para ao crescimento de fibroblastos e queratinócitos, devido à estrutura entre as fibras, formando assim um entrelaçamento entre os poros, deixando-os com tamanhos apropriados para o desenvolvimento celular. No caso do poly ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), estudos mostram que este material permite a aderência, crescimento, viabilidade e boa morfologia das células de fibroblastos (L929) de camundongos, sugerindo assim excelente potencial para aplicações clínicas, substituição e reparo de pele (SERRANO *et al.*, 2004). Já os hidrogéis de quitosana foram capazes de acelerar o reparo tecidual e favorecer a manutenção da umidade do leito da ferida (GARCIA, 2011).

A regeneração dérmica utilizando biomateriais para o tratamento de feridas de pele é o foco da pesquisa de muitos laboratórios. Co-cultivos de células de fibroblastos e queratinócitos em *scaffolds* sinalizaram crescimento ótimo quando comparadas com culturas isoladas dessas células em meio específico de crescimento (KIM *et al.*, 2005).

Biomateriais têm sido utilizados para tratar grandes queimaduras e úlceras crônicas de pele. Estudos com polímeros biodegradáveis como, por exemplo, o poli (ácido láctico-co-ácido-glicólico), PLGA, demonstraram que fibroblastos migraram e proliferaram em um período curto em comparação com outros materiais, demonstrando que este material tem potencial para regeneração de tecidos (KIM *et al.*, 2005).

A celulose bacteriana (CB) é utilizada como biomaterial em diversas pesquisas na engenharia de tecidos (BERTI *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2013; COLLA, 2014; GODINHO, 2014). Ela possui uma rede de nanofibras estruturadas que desempenha um papel importante no crescimento de células pela sua similaridade com a MEC (FEDOROVICH *et al.*, 2007; GECKIL *et al.*, 2010; SIRÓ e PLACKETT, 2010). As fibras da CB apresentam diâmetros aproximados de 20-100 nm, com alta área de superfície e alto grau hidrofílico, sendo ela uma candidata atraente para uma ampla gama de aplicações, com destaque nas áreas biomédicas e biotecnológicas (DAHMAN, 2009; BERTI *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2013; COLLA, 2014; GODINHO, 2014).

A CB é um polímero natural sintetizado por diversas bactérias, entre elas a do gênero *Gluconacetobacter* (BROWN *et al.*, 1976). Essa bactéria sintetiza nanofibras de celulose, que produzem membranas com

características, tais como: biocompatibilidade, elasticidade, transparência e capacidade de manter um ambiente úmido; desse modo, é sugerida como material para reparo de pele, com diversas outras aplicações como guia na regeneração de ossos, cartilagens e vasos sanguíneos (WANG *et al.*, 2009; JEONG *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2011; COLLA, 2014).

### 2.3.2 Celulose bacteriana com incorporação de biomoléculas

A CB pode ser empregada como biomaterial na engenharia de tecidos e medicina regenerativa por ser um polímero puro, com rede aleatória de fibras, em nano-escala tridimensional, apresentando alta capacidade de absorção de água, resistência mecânica, flexibilidade (ROSS *et al.*, 1991; IGUCHI *et al.*, 2000; CZAJA *et al.*, 2006; SIRÓ e PLACKETT, 2010; GODINHO, 2014; LUO *et al.*, 2014).

Estudos vêm sendo desenvolvidos para aperfeiçoar as propriedades e as aplicações da CB. Desta forma, a incorporação de agentes químicos e/ou biológicos nas etapas de produção deste biomaterial poderá aumentar o espectro de aplicação da CB, melhorando suas propriedades físico-químicas (CHEN *et al.*, 2010; GODINHO, 2014).

A *Aloe vera* é uma planta que apresenta propriedades imunoativas, com funções terapêuticas que vêm sendo popularmente utilizadas para uma série de aplicações (DAVIS *et al.*, 1994; VOGLER e ERNST, 1999; YAO *et al.*, 2009; SAIBUATONG e PHISALAPHONG, 2010; SILVA *et al.*, 2014). A *Aloe vera* também conhecida como babosa, designada cientificamente como *Aloe barbadensis*, possui diferentes espécies, como a *Aloe barbadensis* Miller. No tecido parenquimatoso possui um gel mucilaginoso de aspecto gelatinoso claro, que pode ser utilizado para cicatrização de feridas, sendo que a penetração desse gel no tecido lesionado pode impedir o crescimento de bactérias, fungos e vírus, pois este gel apresenta poder anti-inflamatório e imunoregulador (PENG *et al.*, 1991; HUTTER *et al.*, 1996; DAS *et al.*, 2011; BUDAI *et al.*, 2013; RAY e ASWATHA, 2013; KANG *et al.*, 2014). A *Aloe vera* interage com o fator de crescimento de fibroblasto e estimulam a proliferação desses, aumentando a síntese de colágeno (CHITHRA *et al.*, 1998; BELAND, 2006).

O parênquima de reserva (gel) é constituído substancialmente por 98,5% de água e mais de 200 compostos distribuídos entre polissacarídeos, taninos, enzimas, lipídios, aminoácidos e vitaminas.

(KLEIN e PENNEYS, 1988; ESUA e RAUWALD, 2006). Dentre eles, os polissacarídeos compõem mais de 60% da fração sólida do gel, no qual os monômeros manose e glicose constituem aproximadamente 70% da porção polissacarídica (FEMENIA *et al.*, 1999; ESUA e RAUWALD, 2006).

As glucomanas presentes na *Aloe vera* inibem a fibroplasia na cicatrização de feridas, promovendo assim o crescimento e diferenciação de tecidos e auxiliando no tratamento de feridas ocasionadas por queimaduras (MCANALLEY, 1995; HEGGERS *et al.*, 1996).

A *Aloe vera* influencia também no processo de proliferação de células endoteliais envolvidas em uma cascata de sinalização inflamatória, onde há a infiltração de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e aumento da produção de proteína TGF- $\beta$ 1 e de fatores de crescimento endotelial (VEGF) (JETTANACHEAWCHANKIT *et al.*, 2009; ATIBA *et al.*, 2011; ATIBA *et al.*, 2011).

Baseados nas propriedades vantajosas da CB e da *Aloe vera*, novos compostos podem ser desenvolvidos e melhor estudados. Filmes biopoliméricos de CB já foram produzidos em conjunto com a *Aloe vera* por SAIBUATONG e PHISALAPHONG (2010). Neste estudo, comprovaram que o gel de *Aloe vera* 30% incorporados na CB, induz mudanças significativas nas propriedades mecânicas, na cristalinidade, na capacidade de absorção de água e permeabilidade ao vapor d'água. GODINHO (2014) desenvolveu membranas incorporadas com diversas proporções de diferentes frações de *Aloe vera*. Dentre as concentrações formuladas para cada fração utilizada de *Aloe vera*, as suplementações com 60% (v/v) induziram modificações estruturais, mecânicas e químicas mais intensificadas quando comparadas com membranas produzidas com as demais frações.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS INTERAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS NAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE.

Inicialmente foram produzidas membranas de celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana com a incorporação de frações de *Aloe vera* na proporção de 60% de cada fração (CB-Aloe). As folhas de *Aloe vera* foram coletadas nas instalações da empresa Naturama Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda., situado no município de Paulo Lopes, Santa Catarina. Essas folhas foram lavadas com água corrente e lavadas com hipoclorito de cálcio (0,125g/L) por 5 minutos. Em seguida, foi cortada a porção basal das folhas, e retirado o tecido parenquimatoso (GODINHO, 2014).

Logo após este tecido foi triturado, produzindo:

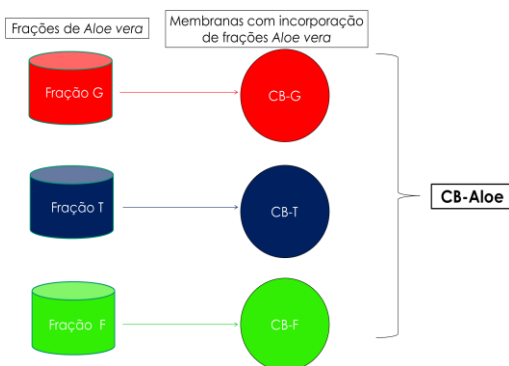
-fração T: nesta fração estão contidos todos os componentes presentes no tecido parenquimatoso da *Aloe vera*. Uma porção desta fração foi centrifugada, produzindo:

-fração G: nesta fração estão contidos os componentes do tecido parenquimatoso da *Aloe vera*, exceto as fibras. Com a Fração G foi produzido:

-fração F: nesta fração estão contidos apenas os polissacarídeos do tecido parenquimatoso da *Aloe vera*.

Membranas foram produzidas utilizando essas frações, conforme ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Esquema ilustrativo das frações de *Aloe vera* e membranas com a incorporação de frações de *Aloe vera* (CB-Aloe).



As membranas de celulose bacteriana (CB) produzidas são assimétricas. Essas membranas apresentam lados com diferença na densidade de fibras produzidas. O lado que está na interface líquido/ar apresenta uma rede de nanofibras mais compacta e densa. Já o lado que está na interface líquido/poço de cultura, apresenta uma rede de fibras mais espaçada quando comparada com o lado oposto da membrana (BERTI *et al.*, 2013; STUMPF *et al.*, 2013).

### 3.1.1 Produção, purificação e esterilização das membranas

#### 3.1.1.1 Produção de membranas de celulose bacteriana (CB)

As membranas de CB foram produzidas segundo o método RECOUVREUX (2008) com pequenas modificações. A bactéria *G. hansenii* (ATCC 23769), obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)" (Fundação André Tosello, Campinas, SP) foi utilizado nas soluções de cultura para a produção das membranas. Foi produzido um inóculo estoque a partir de 10 mL de um inóculo com a bactéria *G. hansenii*. As soluções para a produção das membranas CB foram preparadas com 10% (v/v) desse inóculo estoque mais o meio de cultura manitol.

O meio manitol utilizado para cultivo das membranas de CB, continha: 25 g de manitol (Vetec, Brasil), 5 g de extrato de levedura (Vetec, Brasil) e 3 g de peptona (Himedia, Brasil) diluídos em 1<sup>l</sup> de água destilada. O pH do meio foi ajustado em 6,6 e esterilizado por autoclavagem por 20 minutos a 121°C, 1 atm.

As membranas de CB foram produzidas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça), a cada poço adicionou-se 1 mL da solução de inóculo mais meio de cultura manitol. As placas de cultura de 24 poços foram mantidas em cultura estática à temperatura de 25°C por dez dias. As membranas de CB produzidas na interface líquido/ar de cada poço de cultura foram então removidas para início do processo de purificação.

#### 3.1.1.2 Produção de membranas de celulose bacteriana com a incorporação de frações de *Aloe vera* (CB-Aloe)

A produção da CB-Aloe foi realizada conforme item 3.1.1.1, exceto pela adição de frações de *Aloe vera* na proporção de 60% (v/v) (GODINHO, 2014). A solução foi homogeneizada e adicionada às

---

<sup>1</sup>Neste trabalho, utilizamos o símbolo L para litro no lugar de ℓ, que é recomendado pela S.I.

placas de cultura de 24 poços; em cada poço foi adicionado o volume de 1 mL.

### 3.1.1.3 Purificação e esterilização das membranas CB e CB-Aloe

Após dez dias de cultura bacteriana, com a formação de membranas na interface líquido/ar de cada poço de cultura, as mesmas foram removidas dos poços de cultura e transferidas para um frasco contendo uma solução de NaOH 0,1 M.

As membranas foram mantidas em NaOH por 24 h a 50 °C para remoção de bactérias e/ou resíduos produzidos ao longo dos 10 dias, em modo estático. Em seguida as membranas foram lavadas sucessivamente com água destilada até o pH ser ajustado para sete e as membranas de CB e CB-Aloe foram então esterilizadas por autoclavagem no período de 20 minutos a 121 °C, 1 atm e mantidas em local protegido até utilização na cultura de células (Figura 3).

Figura 3. Membrana de CB após 10 dias de cultivo, após purificação (remoção de bactérias e resíduos) com NaOH.



## 3.2. ANÁLISE DA TOPOLOGIA DE SUPERFÍCIE POR MEV E FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR-ATR DAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE

### 3.2.1 Secagem das membranas por liofilização

As membranas de CB e CB-Aloe foram liofilizadas, no equipamento de modelo L101(Liobras, Brasil). Para o processo de liofilização as amostras devem estar congeladas previamente a -80 °C, e as secagens ocorreram pela sublimação do gelo através da mudança brusca de temperatura no processo, por 48 horas.

### **3.2.2 Análise das membranas de CB e CB-Aloe por FTIR-ATR**

As análises espectroscópicas no infravermelho foram executadas no Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Compósitos, do Departamento de Engenharia Mecânica (Policon/UFSC). As amostras das membranas de CB e CB-Aloe isoladas e liofilizadas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR) (Bruker, Alemanha). Os espectros de FTIR foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de quatro  $\text{cm}^{-1}$  e acumulação de 16 varreduras.

### **3.2.3 Análise das membranas de CB e CB-Aloe por MEV**

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi empregada para verificar a morfologia das membranas CB e CB-Aloe. As membranas secas foram distribuídas sobre fitas de carbono que estavam aderidas sobre os *stubs* e então recobertas com uma camada dupla de ouro. O mesmo procedimento foi utilizado para as outras membranas de CB e CB-Aloe liofilizadas. Após recobrimento as amostras foram analisadas por MEV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) utilizando o equipamento JEOL JSM, modelo 6390LV, Japão.

### **3.2.4 Quantificação da massa seca das membranas CB e CB-Aloe**

As membranas de CB e CB-Aloe hidratadas foram pesadas e posteriormente foram liofilizadas, em seguida elas foram pesadas novamente. Foi utilizada uma balança de modelo CPA 2P (Sartorius, EUA) da Central de Análise do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA/UFSC). Os valores foram calculados com base na relação: Percentual de massa seca =  $(\text{peso da massa da amostra seca} / \text{peso da massa da amostra hidratada}) \times 100$ . Os valores foram normalizados com o valor da massa da CB pura.

## **3.3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro***

### **3.3.1 Culturas de células epiteliais**

As células epiteliais utilizadas nessa dissertação foram: fibroblastos primários, extraídos de resíduo de pele (HDFa), gentilmente



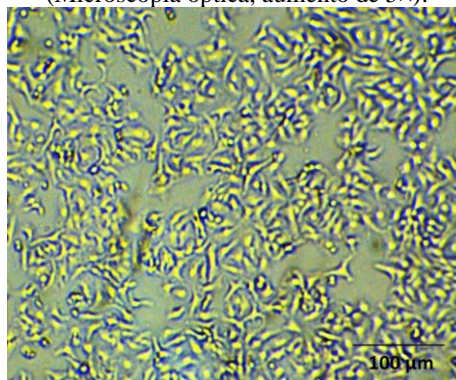
fornecidos pelo banco de células do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); queratinócitos da linhagem imortalizada HaCat, gentilmente fornecidos pelo banco de células do Laboratório de Substâncias Antitumorais da UFMG.

As células epiteliais foram mantidas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco®/Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, EUA) em atmosfera úmida, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizada uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em cada placa de Petri (TPP, Suíça) para propagação nas passagens de 05 - 09, conforme observadas nas Figuras 4 e 5.

Figura 4. Fibroblastos primários de derme humana (HDFa) em processo de propagação celular. (Microscopia óptica, aumento de 5×).



Figura 5. Queratinócitos (HaCat) em processo de propagação celular. (Microscopia óptica, aumento de 5×).



### 3.3.2 Atividade metabólica celular

A atividade metabólica foi determinada pela atividade mitocondrial das células pelo do ensaio colorimétrico do MTS (Promega, Brasil). O composto MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] é biorreduzido em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura, formazan. Este processo é realizado por enzimas mitocondriais, sendo que a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, que foi medida em termos de absorbância. A leitura da absorbância da solução a 490 nm foi realizada em leitor de microplacas (Thermo Plate, modelo TP Reader, Brasil). As células de HDFA e HaCat foram semeadas sobre a superfície mais porosa das membranas, cultivadas na densidade de  $10^5$  células/membrana. A atividade metabólica foi avaliada em função do tempo, no período de 1, 3 e 7 dias de cultura. Para cada tempo avaliado, o meio de cultura foi removido, as amostras lavadas três vezes com PBS e transferidas para uma nova placa de cultura. Então, 300µL de meio de cultura e 60µL do reagente MTS foram adicionados em cada poço da placa de cultura com as amostras. As placas de cultura foram incubadas por 1 h a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Logo após, a solução (meio de cultura + MTS) foi homogeneizada, e 100µL da solução de cada amostra foram transferidos para uma nova placa de 96 poços para realizar a leitura no espectrofotômetro.

Paralelamente ao ensaio de MTS foi realizada também a análise qualitativa de viabilidade celular pelo do ensaio *Live/Dead*<sup>®</sup>. O kit *Live/Dead*<sup>®</sup> *Viability/Cytotoxicity* (Invitrogen, Brasil) é utilizado apenas para células de mamíferos; sua função é medir a atividade intracelular das esterases (calceína) e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio). Uma solução com calceína e homodímero de etídio (4:1) em PBS foi preparada, e 100µL desta solução foram adicionados sobre cada amostra. Logo após, a placa de cultura foi incubada por 30 minutos a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação as amostras foram montadas em lâminas e visualizadas em um microscópio de fluorescência de modelo Eclipse Ci-L (Nikon, Japão).

### 3.3.3 Proliferação celular

A análise da proliferação celular foi realizada em três tempos experimentais (1, 3 e 7 dias), utilizando densidade de  $10^6$  células/membrana em cada amostra (CB e CB-Aloe). Para cada tempo

as amostras foram lavadas com PBS e deixadas com 1 mL de água ultrapura por uma hora em atmosfera úmida, a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Depois disso, a placa foi retirada e armazenada em *freezer* de -80 °C até análise. Por choque osmótico o DNA das células irá ser liberado para o meio. O kit *PicoGreen dsDNA Quantification* (Molecular Probes, EUA) foi utilizado para quantificar a proliferação celular. Para cada amostra foi adicionado *PicoGreen*, esse reagente irá se ligar ao dsDNA das células e quantificará a proliferação celular das células epiteliais quando cultivadas nas membranas de CB e CB-Aloe. Uma curva padrão de  $\lambda$ DNA foi construída ao mesmo tempo da análise. Desta forma foi possível obter uma equação da reta, para calcular o valor das concentrações de DNA presentes nas amostras. As amostras foram incubadas por 2 a 5 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Logo após foi analisado por fluorescência, obtendo-se a densidade ótica das amostras. Para a análise foi utilizando Multileitora *Infinite* (modelo M200 TECAN/LAMEB 1-UFSC) com filtro de excitação em 480 nm e filtro de emissão de 530 nm.

### 3.3.4 Avaliação de adesão e morfologia celular

#### 3.3.4.1 Secagem das membranas por desidratação com soluções de etanol

As membranas de CB e CB-Aloe, com células epiteliais cultivadas por 24 horas sobre a superfície mais porosa das membranas, foram lavadas três vezes com PBS (*phosphate buffered saline*) e fixadas com glutaraldeído 2,5% (1 h, 4 °C). Em seguida as membranas foram desidratadas com uma série de soluções de etanol (30%, 50%, 70% e 100%) por quinze minutos cada.

#### 3.3.4.2 Secagem por ponto crítico de CO<sub>2</sub>

Posteriormente à secagem das membranas por desidratação com soluções de etanol, as amostras foram distribuídas sobre redes metálicas de secagem da câmara de Balzer. As amostras foram processadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) e submetidas à no mínimo três substituições de álcool por CO<sub>2</sub> líquido, utilizando o equipamento de modelo EM CPD030 (Leica, Alemanha).

#### 3.3.4.3 Análise de adesão das células sobre as membranas de CB e CB-Aloe por MEV

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi empregada para verificar a morfologia das células epiteliais (HDFa e HaCat) quando cultivadas em membranas CB e CB-Aloe. As

membranas com as células secas no ponto crítico foram distribuídas sobre fitas de carbono que estavam aderidas sobre os *stubs* e então recobertas com uma camada dupla de ouro. Após recobrimento as amostras foram analisadas por MEV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) utilizando o equipamento JEOL JSM, modelo 6390LV, Japão.

#### 3.3.4.4 Análise da morfologia das células sobre membranas de CB e CB-Aloe por faloidina e DAPI

A morfologia das células aderidas à membrana foi avaliada por microscopia de fluorescência. HDFa e HaCat foram semeadas na densidade de  $10^5$  células/membrana e cultivados por três dias. As células foram fixadas com formaldeído 3,7% em PBS e permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 (Sigma Aldrich, EUA) em PBS. Para visualizar os filamentos de F-actina as células foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Molecular Probes Inc., EUA). O núcleo das células foi corado com o sal dihidroclorídrico, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes Inc., EUA). As amostras foram montadas em lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência (Eclipse Ci-L, Nikon, Japão).

#### 3.3.5 Biossíntese de colágeno pelos fibroblastos (HDFa)

HDFa foram cultivadas sobre a superfície das membranas de CB e CB-Aloe, por um período de sete dias. As células foram então lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 3,7% por uma hora em temperatura de 25°C. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS e deixadas sem exposição, na câmara de fluxo laminar, para secagem por 45 minutos. As amostras foram então coradas com 200 µL de solução vermelho Sirius 0,5g (*Direct Red* 80% - *Dye content* 25% - Sigma, EUA) em 500 mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico, durante uma hora em temperatura de 25 °C, protegido da luz. O sobrenadante foi removido e as amostras foram lavadas com 250 µL de ácido clorídrico 0,01M para remoção do corante não fixado. As fibras de colágeno coradas foram solubilizadas pela adição de 150 µL de hidróxido de sódio 0,01M e deixadas em solução durante uma hora.

Os resultados da biossíntese de colágeno foram obtidos pelo espectrofotômetro, modelo Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, EUA). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 535 nm e os dados foram expressos em porcentagem média da síntese de colágeno. Os resultados foram comparados com a curva padrão de colágeno de

tecido conjuntivo de pele bovino, gentilmente fornecido pelo Dr. Durvanei Augusto Maria do Instituto Butantan.

### 3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos foram avaliadas por Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . O software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

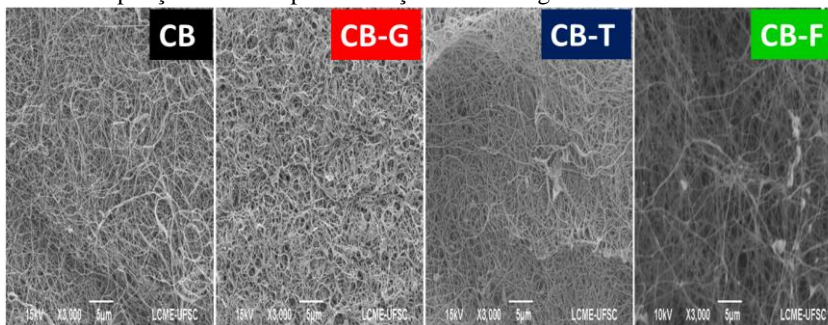


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ANÁLISE DA TOPOLOGIA DE SUPERFÍCIE DAS MEMBRANAS POR MEV

A microestrutura das membranas de CB e CB-Aloe foi analisada utilizando-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). De acordo com a Figura 6, as membranas CB e CB-Aloe apresentam uma rede de fibras entrelaçadas com poros de tamanhos variados.

Figura 6. Micrografia das membranas CB e CB-Aloe obtidas por MEV. As membranas CB-Aloe foram produzidas com a adição de 60% de frações de *Aloe vera*. A ampliação utilizada para obtenção das micrografias foi de 3000×.



A membrana CB-F apresentou uma rede de fibras mais espaçada com relação à CB. Já as membranas CB-G e CB-T apresentaram uma rede de fibras mais compactadas assemelhando-se à estrutura da CB. A rede de fibras de todas as membranas apresentou-se interconectada ao longo de toda região observada na membrana. Esse fato já havia sido reportado por GODINHO (2014). A autora descreveu que as membranas CB-Aloe produzidas com 60% de frações de *Aloe vera* apresentaram a superfície inferior (mais porosa) com densidade de fibras similar à microestrutura da superfície inferior da CB pura.

A organização e distribuição da rede de nanofibras estão de acordo com o estudo descrito por MURPHY (2010), para membranas de CB produzidas em modo estático, cujas microestruturas foram consideradas promissoras para o desenvolvimento de plataforma de estudos para a engenharia de tecidos. Análises de MEV-FEG realizadas em nosso grupo mostram agregados fibrosos da ordem de 20 nm. Desta forma, a rede de fibras que constitui a membrana de CB influencia

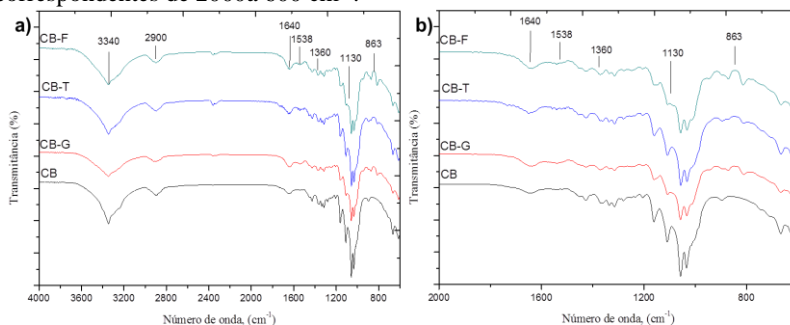
significativamente a conexão de células cultivadas sobre elas, afetando o processo de viabilidade, migração, proliferação e produção de matriz extracelular (YANG, 2001; BERTI *et al.*, 2013).

#### 4.2. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA POR FTIR-ATR

As membranas de CB e CB-Aloe foram analisadas por espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) combinada com Refletância Total Atenuada (ATR) com o objetivo de caracterizar quimicamente e identificar os grupos funcionais presentes nas amostras. A espectroscopia no infravermelho (IR) atribui bandas ou picos relacionados à orientação e estrutura das moléculas presentes em materiais distintos (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2007; FAN *et al.*, 2012).

A região estudada para análise das membranas CB e CB-Aloe abrangeu a janela espectral entre os picos correspondentes de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . Como ilustrado na Figura 7, a janela espectral corresponde às bandas ou picos de grupos funcionais que caracterizam as membranas estudadas.

Figura 7. **a)** Espectro de FTIR-ATR das membranas desidratadas de (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F, na janela espectral entre os picos correspondentes de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . **b)** Espectro de FTIR-ATR das membranas desidratadas de (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F, com janela espectral entre os picos correspondentes de 2000a 600  $\text{cm}^{-1}$ .



A Figura 7 (a) mostra o perfil do FTIR-ATR das amostras das membranas de CB e CB-Aloe (CB-G, CB-T e CB-F), na janela espectral entre os picos correspondentes de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 3340  $\text{cm}^{-1}$  é similar nas membranas CB e CB-Aloe, e as bandas nessa região apresentam alta intensidade do sinal que identifica a presença de grupos



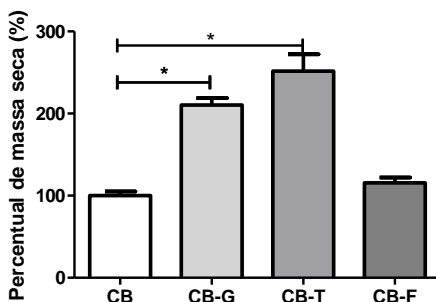
hidroxilas e a presença de interações de hidrogênio intra e intermolecular (WATANABE *et al.*, 2006; 2007; LIN *et al.*, 2013). A banda de absorção em  $2900\text{ cm}^{-1}$  nas membranas CB e CB-Aloe apresenta-se com menor intensidade, estando relacionada com a presença de grupos alcanos alifáticos, presentes na celulose. As bandas de absorção na região de  $1640$  e  $1594\text{ cm}^{-1}$  nas membranas CB-Aloe, podem ser atribuídas pela presença de grupo amino e de grupos amidas primárias e secundárias (KLEMM *et al.*, 2001; SAIBUATONG e PHISALAPHONG, 2010). Também observam-se as bandas de absorção na região em  $1538$  e  $1360\text{ cm}^{-1}$  apresentando picos com baixa intensidade em todas as membranas. Esses picos são referentes à presença de grupos  $\text{NH}_2$ , bandas associadas à deformação axial do grupamento funcional  $\text{C}=\text{O}$  assim como a deformação do grupamento  $\text{NH}_2$  de amidas primárias e secundárias (DÉLÉRIS e PETIBOIS, 2003; LIN *et al.*, 2013; GODINHO, 2014), já identificados na região do pico  $1594\text{ cm}^{-1}$ . Podemos sugerir que os picos que abrangem a faixa de  $1594$ - $1360\text{ cm}^{-1}$  são referentes à presença de proteínas presentes na *Aloe vera*, esta informação pode ser observada com mais clareza na Figura 7 (b). Nas membranas CB e CB-T observa-se um pico com maior intensidade em  $1130\text{ cm}^{-1}$ , identifica-se a presença de polissacarídeos, inclusive de celulose (MOVASAGHI *et al.*, 2008). A membrana CB-T apresenta maior intensidade nesse pico, pois nessa membrana há presença de todos os compostos presentes no tecido parenquimatoso da *Aloe vera*, quando comparamos com as CB-G e CB-F. Na Figura 7 (b) identifica-se que o pico  $863\text{ cm}^{-1}$  possui maior intensidade na CB-F do que nas membranas CB-G e CB-T, este pico está relacionado com a presença de anéis piranosídicos, tais como  $\beta$ -D-manoses e  $\beta$ -D-glicoses, presentes na *Aloe vera* (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2002; GODINHO, 2014).

Saibuatong e colaboradores (2010) descreveram que a adição de gel de *Aloe vera* em membranas de CB nas proporções 30-50% (v/v), implicou na incidência de interações intermoleculares entre CB e o grupo amino proveniente da *Aloe vera*. Compilando os espectros de CB e CB-Aloe (Figura 7) foi possível concluir, que há pequenas variações no espectro de absorção referente aos grupos carbonilas, grupo amino e também identifica-se à presença de anéis piranosídicos, tais como  $\beta$ -D-manoses e  $\beta$ -D-glicoses identificados nas regiões do pico  $1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1594\text{ cm}^{-1}$  e  $863\text{ cm}^{-1}$ . Desta forma podemos identificar uma interação intermolecular dessas frações de *Aloe vera* com os componentes presentes na CB pura, observadas na superfície das membranas CB e CB-Aloe (Figura 6).

### 4.3. MASSA SECA DAS MEMBRANAS CB E CB-ALOE

A massa seca das membranas de CB e CB-Aloe foi quantificada para confirmar se os componentes das frações de *Aloe vera* foram diferentemente incorporados na membrana de CB durante o processo de síntese, Figura 8.

Figura 8. Massa das membranas de celulose bacteriana pura e com a incorporação de frações de *Aloe vera* após serem liofilizadas. Os dados foram normalizados em relação à CB pura. As barras representam o desvio padrão médio e \* representa as diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre a CB e CB-Aloe.



Observando a Figura 8, identifica-se um acréscimo no percentual de massa seca nas membranas CB-G e CB-T. O aumento de massa seca nas membranas foi de 110% para as membranas CB-G e de 151% para as membranas CB-T, quando comparadas com a CB pura. Quando comparamos a diferença de massa seca entre as membranas de CB-Aloe, observa-se que houve diferença significativa entre as membranas de CB-G e CB-F na ordem de 94% e entre as membranas CB-T e CB-F essa diferença foi de 136%. Esses resultados corroboraram com os resultados de Godinho (2014), que identificou que nas membranas CB-T houve um aumento no percentual de massa seca em relação às outras membranas CB-G e CB-F, evidenciando maior incorporação de componentes de *Aloe vera* na estrutura da membrana de celulose. Comparando a membrana de CB com a membrana de CB-F após eventual incorporação, não foi detectada diferença significativa em relação à massa seca. Mas quando comparada a membrana CB-F com as demais incorporações de componentes de *Aloe vera*, foi evidenciada as diferenças significativas entre as membranas de CB-G e CB-T. Sugere-se que os polissacarídeos agregados à CB referentes à incorporação da

fração F não aumenta significativamente a massa seca destas membranas. Essa diferença foi evidenciada nos próximos testes *in vitro*, em que a atividade metabólica e proliferação das células epiteliais apresentaram taxas menores quando cultivadas na CB-F quando comparadas com as outras membranas (CB-G e CB-T).

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *in vitro*

Ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar a atividade metabólica, viabilidade celular, proliferação, adesão e morfologia das células epiteliais humanas, fibroblastos primários (HDFa) e queratinócitos (HaCat), cultivadas sobre a superfície mais porosa das membranas CB e CB-Aloe, após 1, 3 e 7 dias de cultivo, considerando-se como grupo controle as membranas de CB pura, para todos os testes realizados nesse estudo.

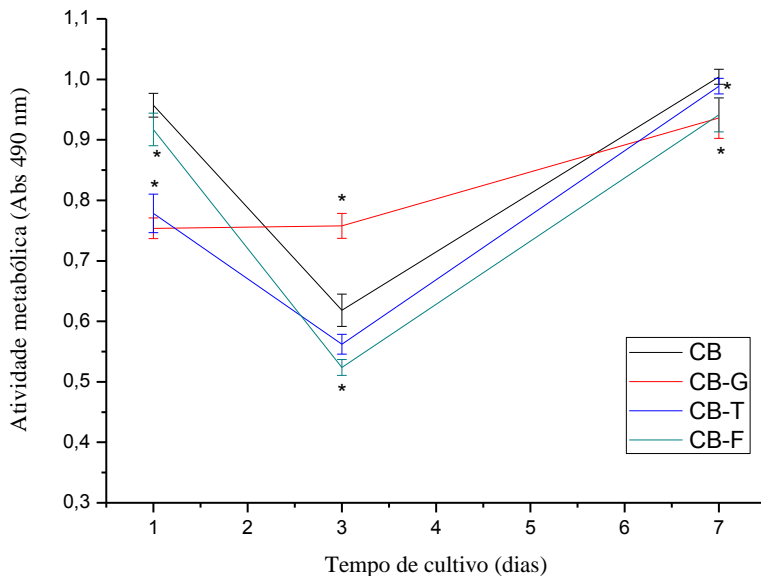
##### 4.4.1 Atividade metabólica fibroblastos primários (HDFa)

Os resultados de atividade metabólica obtidos no cultivo de HDFa sobre as membranas de CB e CB-Aloe durante sete dias de cultivo celular são mostrados na Figura 9.

Na Figura 9 observa-se que a atividade metabólica das células HDFa quando cultivadas sobre a CB-G aumenta no terceiro dia de cultivo, permanecendo até o sétimo dia de cultivo celular. Observa-se que a atividade metabólica da HDFa no terceiro dia foi reduzida quando cultivada sobre as membranas de CB-T e CB-F. Contudo, a atividade metabólica da HDFa aumenta quando cultivada por sete dias sobre as membranas CB-Aloe. A atividade metabólica das HDFa diminuiu no terceiro dia de cultivo quando cultivadas sobre a membrana de CB pura, mas apresentou um aumento no perfil metabólico no sétimo de cultivo sobre a CB. Assim identifica-se que a atividade metabólica no sétimo dia foi similar nas membranas de CB e CB-Aloe.

Diferenças significativas na atividade metabólica de HDFa foram quantificadas quando cultivadas nas membranas CB-G no terceiro e no sétimo dias de cultivo. Já nas membranas CB-T só houve diferença significativa no primeiro dia de cultivo. Nas membranas CB-F houve diferenças significativas em todo o tempo experimental.

Figura 9. Atividade metabólica de HDFa cultivadas sobre membranas de CB e CB-Aloe durante 1, 3 e 7 dias de cultivo *in vitro*. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e \* representa as diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre a CB e CB-Aloe.

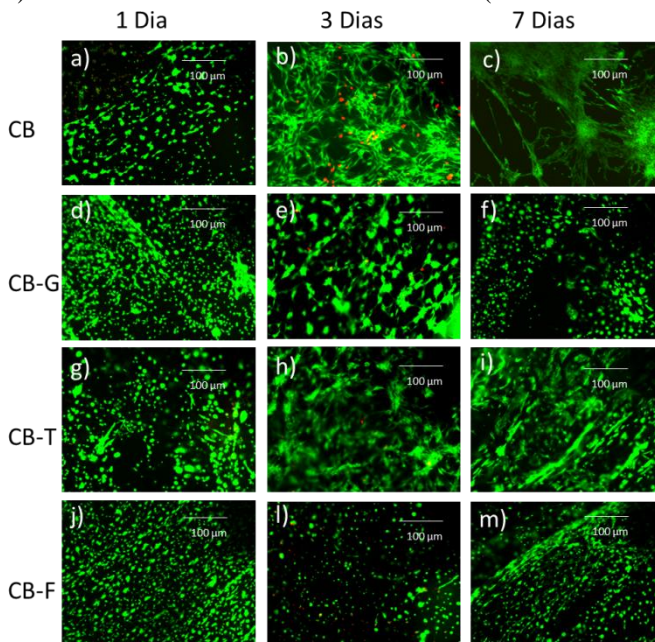


A atividade metabólica de fibroblastos foi avaliada por CHIAOPRAKOBKIJ e seus colaboradores (2011). Os autores cultivaram fibroblastos sobre membranas de CB e compósitos de alginato, sendo que os resultados obtidos até 48 horas de cultivo celular sobre essas membranas identificaram que a atividade metabólica dos fibroblastos foi maior quando eles foram cultivados sobre as membranas de CB do que nos compósitos.

A diminuição nos valores de atividade metabólica no terceiro dia de cultivo celular (Figura 9), também foi observada por BERTI e colaboradores (2013), quando células endoteliais humanas foram cultivadas na membrana de CB por 3 dias de cultivo (BERTI *et al.*, 2013). Desta forma acredita-se que esta diminuição nos valores da atividade metabólica deve-se à adaptação da célula à microestrutura do material, pois, geralmente, após 3 dias de cultura na superfície porosa da CB, as células tendem a recuperar o seu perfil metabólico (BERTI *et al.*, 2013).

Para complementação da análise *in vitro*, foi realizada por microscopia de fluorescência a análise da viabilidade celular. Foram realizados testes utilizando o kit *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity*, onde a coloração em verde, pela calceína, indica células vivas, enquanto que em vermelho, pelo homodímero de etídio, identifica células mortas. Pode-se observar na Figura 10 a predominância de células HDFa viáveis aderidas à superfície de todas as membranas testadas. Existem regiões com células vivas e mortas presentes em algumas membranas analisadas: (a) e (b) CB, (e) CB-G, (h) e (g) CB-T e a (l) CB-F.

Figura 10. Viabilidade celular das HDFa, analisadas por microscopia de fluorescência, pelo do kit *Live/Dead®*. As células vivas estão coradas em verde (calceína) e células mortas estão coradas em vermelho (homodímero de etídio).



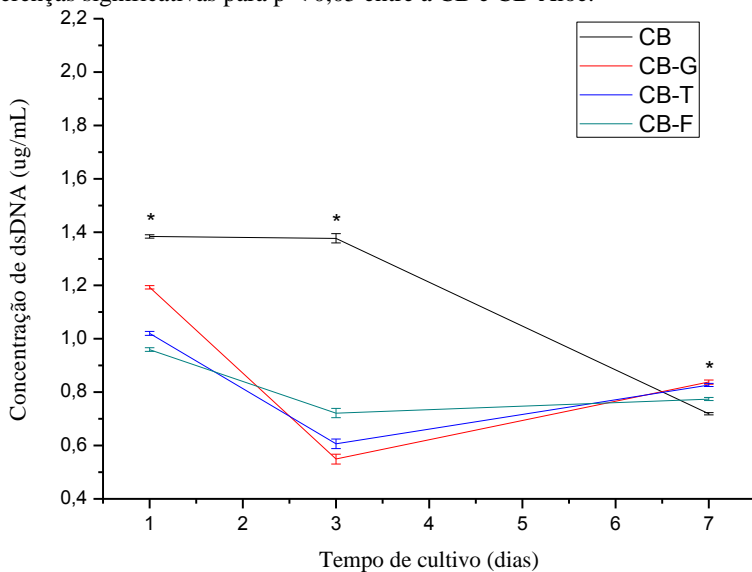
Resultados preliminares indicaram que as membranas de CB e CB-Aloe não são citotóxicas para células de camundongo L929 (GODINHO, 2014). Desta forma, os resultados obtidos mostram que as membranas de CB-Aloe também não são citotóxicas para fibroblastos humanos provenientes de cultura de células primárias.

#### 4.4.2 Proliferação de fibroblastos primários (HDFa)

Na Figura 11 observa-se os resultados obtidos de proliferação de HDFa cultivadas sobre CB e CB-Aloe. No terceiro dia de cultivo observa-se que a proliferação de HDFa diminuiu quando cultivadas sobre as membranas de CB-Aloe. Entretanto, no sétimo dia de cultivo sobre essas membranas a proliferação de HDFa aumentou, apresentando valores similares aos obtidos na CB pura.

Diferenças significativas ocorreram entre todas as combinações de CB e CB-Aloe ao longo do período de cultura.

Figura 11. Proliferação celular de fibroblastos cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e \* representa as diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre a CB e CB-Aloe.



A diminuição da proliferação das HDFa quando cultivadas sobre a CB pode estar ligada ao fato da falta de nutrientes necessários para estas células se duplicarem e também possa ter ocorrido um aumento significativo na densidade celular, fazendo com que o espaço de cultivo celular tenha alcançado o seu limite (REKUS, 2000).

Evidências comprovam que alguns compostos presentes na *Aloe vera* estimulam a proliferação celular.

JETTANACHEAWCHANKIT e colaboradores (2009) identificaram que uma solução contendo acemanana (polissacarídeo) estimulou a proliferação de fibroblastos de gengiva e a produção de algumas proteínas de matriz extracelular. Yao e colaboradores (2009) utilizaram uma solução com fração polissacarídica de *Aloe vera*, e os resultados obtidos demonstraram que essa solução promove a proliferação de fibroblastos humanos *in vitro*.

Assim o aumento da proliferação de HDFa no sétimo dia de cultivo sobre as membranas CB-Aloe pode ter ocorrido com influência da presença de componentes das frações de *Aloe vera*, as quais estão incorporadas nas membranas de CB. O aumento da concentração de componentes presentes nas frações de *Aloe vera* nas membranas de CB já havia sido investigado e os resultados mostraram que a proliferação celular aumenta com o aumento da concentração destes componentes (YAO *et al*, 2009).

Conclui-se assim que a atividade metabólica se manteve similar nas CB e CB-Aloe (Figura 9). Na Figura 10 observa-se uma densidade celular similar ao longo do tempo de cultivo de HDFa sobre todas as membranas CB e CB-Aloe, evidenciando viabilidade celular quando observa-se células viáveis coradas em verdes. Na Figura 11 observa-se que a proliferação de fibroblastos cultivados sobre as membranas de CB-Aloe foi estimulada quando comparadas ao perfil de proliferação destas células cultivadas na CB.

#### **4.4.3 Atividade metabólica de queratinócitos humanos (HaCat)**

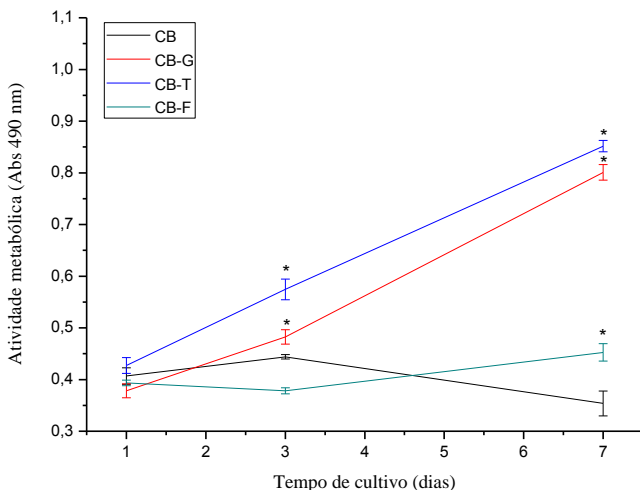
A atividade metabólica das células HaCat cultivadas sobre as membranas CB e CB-Aloe durante 1, 3 e 7 dias pode ser observada na Figura 12.

A Figura 12 mostra que a atividade metabólica de HaCat quando cultivada sobre a CB-G e CB-T apresenta um perfil crescente de atividade metabólica durante sete dias de cultivo celular. Nas membranas de CB-F a atividade metabólica de HaCat até o terceiro dia foi um pouco inferior à observada na CB pura, sendo que houve um aumento de células metabolicamente ativas no sétimo dia de cultivo. Os resultados demonstram que no primeiro e no terceiro dia de cultivo celular, a atividade metabólica das HaCat cultivadas na CB teve aumento, mas a atividade metabólica decai no sétimo dia de cultivo.

Diferenças significativas de atividade metabólica de HaCat quando cultivadas em CB-G ocorreram no terceiro e no sétimo dia de cultivo celular. Nas membranas de CB-T foram observadas diferenças

significativas no primeiro dia e no sétimo de cultivo. Diferenças significativas da atividade metabólica de HaCat ocorreram entre as membranas CB pura e CB-F no sétimo dia de cultivo.

Figura 12. Atividade metabólica de queratinócitos HaCat cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe durante 1, 3 e 7 dias de cultivo *in vitro*. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e \* representa as diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre a CB e CB-Aloe.



Os resultados obtidos neste estudo de atividade metabólica de HaCat mostram que as células permaneceram metabolicamente ativas até 72 horas de cultivo sobre a membrana de CB. Estes resultados corroboram com os resultados do estudo de CHIAOPRAKOBKIJ e seus colaboradores (2011) que avaliaram que durante 48 horas de cultivo das HaCat sobre as membranas de CB a atividade metabólica foi maior do que quando as HaCat foram cultivadas sobre os compósitos de alginato.

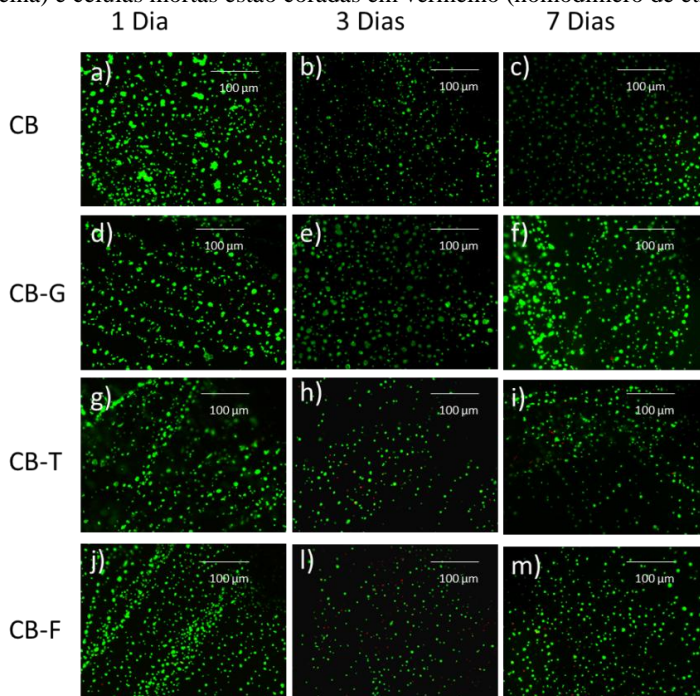
A diminuição da atividade metabólica das HaCat quando cultivada sobre a membrana de CB no sétimo dia de cultura pode estar correlacionada com o processo de diferenciação e organização da estrutura celular (pavimentos celulares) que as células HaCat passam após uma semana de cultura (SCHOOP *et al.*, 1999). Contudo esse processo de diferenciação pode ter sido retardado nas células HaCat quando cultivadas nas membranas CB-Aloe, pois a atividade metabólica dessas células aumenta no sétimo dia de cultivo. Este aumento pode estar correlacionado com o estímulo dos componentes presentes nas



frações de *Aloe vera* (MCANALLEY, 1995; HEGGERS *et al.*, 1996; JETTANACHEAWCHANKIT *et al.*, 2009; ATIBA *et al.*, 2011).

Na Figura 13 observa-se células HaCat coradas em verde pela calceína, indicando células vivas, enquanto que as células coradas em vermelho pelo homodímero de etídio identifica células mortas. Observa-se a predominância de células HaCat viáveis na superfície de todas as membranas. Contudo, observa-se que na membrana CB-F, Figura 13 (l), equivalente ao terceiro dia de cultivo, a quantidade de células mortas teve um aumento quando comparadas com as mesmas membranas ao longo do mesmo período de cultura.

Figura 13. Viabilidade celular das HaCat, analisadas por microscopia de fluorescência, pelo do kit *Live/Dead*<sup>®</sup>. As células vivas estão coradas em verde (calceína) e células mortas estão coradas em vermelho (homodímero de etídio).



Os resultados obtidos em relação à atividade metabólica e a viabilidade celular das células epiteliais corroboraram os resultados de Godinho (2014), para fibroblastos L929. Assim evidencia-se que as

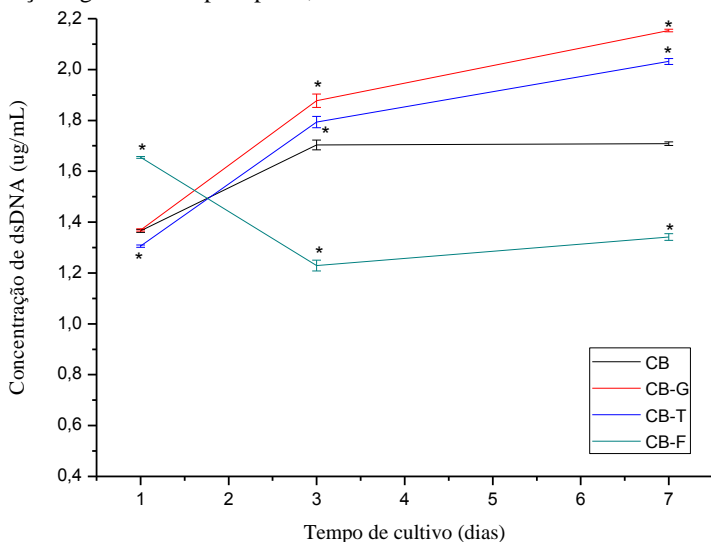
membranas CB e CB-Aloe com células epiteliais não apresentaram citotoxicidade quando cultivadas sobre as superfícies das mesmas.

#### 4.4.4 Proliferação de queratinócitos humanos (HaCat)

A proliferação celular foi determinada pela quantificação de dsDNA (kit *PicoGreen*), liberado após lise das células HaCat cultivadas sobre as membranas de CB e CB-Aloe (Figuras 14).

Na Figura 14 observa-se que as HaCat mantêm-se proliferativas quando cultivadas sobre a CB-G e CB-T, apresentando um perfil crescente de proliferação até o sétimo dia de cultivo. A proliferação de HaCat sobre CB pura é evidenciada a partir do terceiro dia, sendo que até o sétimo dia cultivo as células mantiveram-se proliferativas. A proliferação das HaCat quando cultivadas sobre a CB-F diminuiu no terceiro dia de cultivo e aumentou no sétimo dia de cultivo. Diferenças significativas ocorreram entre a CB e CB-G ao longo do período de cultura, exceto no primeiro dia de cultivo. Diferenças significativas ocorreram em todas as membranas CB e CB-T e CB e CB-F ao longo do período de cultivo.

Figura 14. Proliferação celular de HaCat cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo experimental. As barras representam o desvio padrão médio e \* representa as diferenças significativas para  $p < 0,05$  entre a CB e CB-Aloe.



Os resultados obtidos de proliferação de HaCat cultivados sobre membranas de CB-G e CB-T demonstram que essas superfícies foram eficientes e mantiveram proliferação celular na maior parte do período experimental testado. Foram quantificados valores superiores aos encontrados com a mesma quantidade de células semeadas sobre a membrana controle CB pura.

DETERSE e seus colaboradores (2001) testaram concentrações diferentes de extrato contendo polissacarídeos da planta *Hamamelis virginiana*, a qual é utilizada para tratamento de feridas de pele. A proliferação de HaCat quando em contato com essas soluções apresentou maior atividade proliferativa na concentração de 10 µg/mL em nove dias de cultivo. Os autores ressaltam ainda que alguns indutores de proliferação presentes nessas soluções apresentam semelhança com os presentes em outras plantas, como por exemplo, no gel de *Aloe vera* aqui utilizado. Adicionalmente os resultados obtidos por JETTANACHEAWCHANKIT e colaboradores (2009) identificaram alguns indutores de proliferação (acemanana) presentes no gel de *Aloe vera*.

Conclui-se que a atividade metabólica e a proliferação das HaCat quando cultivadas sobre CB-G e CB-T apresentam um perfil crescente de proliferação até o sétimo dia de cultivo (Figuras 12 e 14). HaCat cultivadas sobre CB e CB-Aloe apresentaram-se viáveis no período de cultivo celular (Figura 13).

#### **4.4.5 Adesão e morfologia de células epiteliais**

A adesão e a morfologia das células epiteliais cultivadas sobre as membranas de CB e CB-Aloe foram analisadas utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia de fluorescência, após coloração específica do núcleo com DAPI e citoesqueleto celular com faloidina.

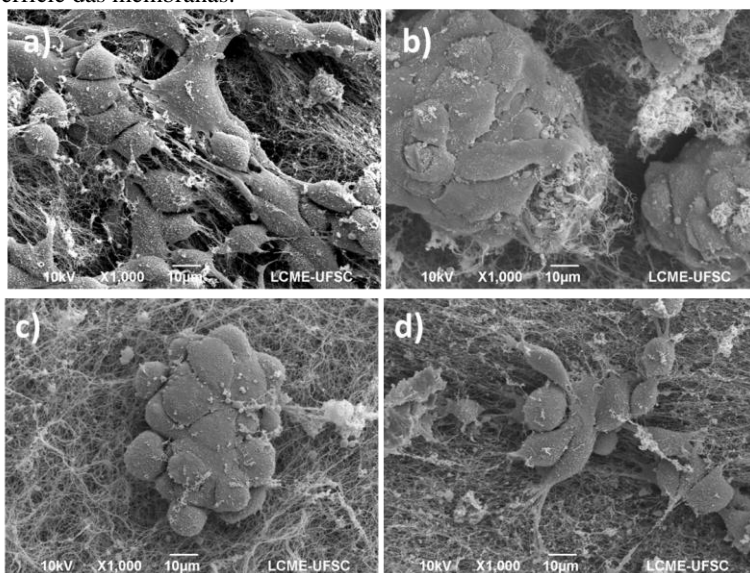
##### **4.4.5.1 Fibroblastos primários (HDFa)**

Nas Figuras 15 e 16 podemos observar micrografias obtidas por MEV de HDFa cultivadas por 24 horas nas superfícies das membranas CB (a), CB-G (b), CB-T (c) e CB-F (d).

Na Figura 15 observa-se HDFa aderidas na superfície das membranas CB e CB-Aloe. As células HDFa apresentam morfologia espalhada quando cultivadas sobre as membranas (a) CB e (d) CB-F; já nas membranas (b) CB-G e (c) CB-T as HDFa apresentam-se como aglomerados celulares, com morfologia arredondada, mas permanecem

aderentes à superfície das membranas. Desta forma, podemos evidenciar interação forte célula/biomaterial, pela morfologia apresentada nas membranas CB e CB-F, enquanto que nas membranas CB-G e CB-T a interação foi intermediária. Morfologicamente, as células HDfa quando cultivadas sobre membranas de CB sem a incorporação de *Aloe vera* apresentam um fenótipo característico de células fibroblásticas (espraiadas) comparadas às cultivadas nas CB-Aloe.

Figura 15. Micrografias obtidas por MEV de membranas de CB (a), CB-G (b), CB-T (c) e CB-F (d) mostrando fibroblastos cultivados por 24 horas, aderidos à superfície das membranas.

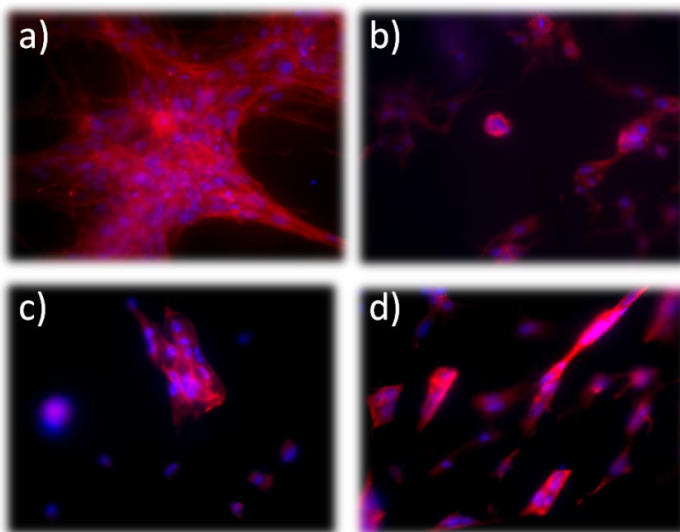


Os resultados obtidos corroboram com os resultados de CHIAOPRAKOBKIJ e seus colaboradores (2011) que testaram fibroblastos cultivados sobre celulose bacteriana e compósitos de alginato (polissacarídeo natural) durante 48 horas. Estes autores observaram que os fibroblastos cresceram com morfologia normal sobre a celulose bacteriana, já os fibroblastos cultivados sobre os compósitos de alginato estavam apenas fixos, com células na forma arredonda, indicando baixa interação biomaterial/célula. Estes mesmos autores observaram ainda a presença de poucas células sobre os compósitos com alginato.

Para evidenciar a morfologia das células epiteliais cultivadas sobre as membranas CB e CB-Aloe, após sete dias de cultivo (Figura 16), foram corados os filamentos do citoesqueleto por faloidina (vermelho) e do núcleo por DAPI (azul).

A Figura 16 mostra as células HDFa cultivadas sobre as membranas de CB e CB-Aloe. Como observado anteriormente por MEV, os fibroblastos encontram-se espalhados quando cultivados sobre a membrana de CB. Em relação às membranas de CB-Aloe a membrana que apresentou maior espalhamento celular, observado por MEV e por microscopia de fluorescência foi a membrana CB-F (d).

Figura 16. Morfologia de fibroblastos cultivados sobre as membranas (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F. Os filamentos de F-actina que compõem o citoesqueleto das células HDFa aparecem corados por faloidina (vermelho) e os núcleos por DAPI (azul).



Na Figura 16 está evidenciada a adesão e o espalhamento de fibroblastos cultivados sobre membranas CB e CB-Aloe. Observa-se que as células cultivadas sobre (a) CB apresentam morfologia espalhada e com seus citoesqueletos organizados na superfície das membranas. Sobre a membrana (d) CB-F, as células apresentam morfologia espalhada, menos clara do que a observada anteriormente, e com adesão sobre a membrana. Quando observadas sobre as membranas (b) CB-G e (c) CB-T as células encontram-se morfologicamente mais arredondadas,

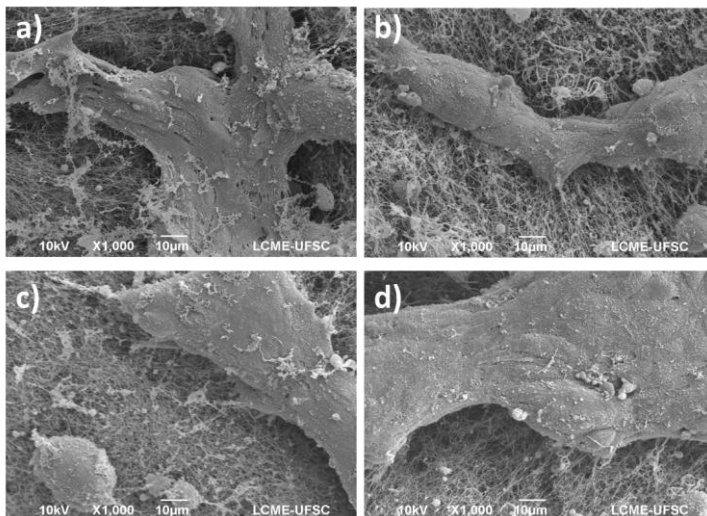
principalmente no que se refere à adesão das células nas membranas CB-T (c).

A morfologia celular é influenciada pela confluência ou densidade de células (PALSSON, 2004). Os fibroblastos interconectados apresentam natureza contrátil. Então, se a força de contração entre a rede interconectada das células for mais intensa do que a força de adesão entre os fibroblastos e a membrana, grupos de células serão formados (SANCHAVANAKIT *et al.*, 2006).

#### 4.4.5.2 Queratinócitos humanos (HaCat)

A Figura 17 mostra queratinócitos aderidos e espalhados na superfície de todas as membranas de CB e CB-Aloe, evidenciando uma interação forte entre células/biomaterial, esta interação foi observada pela morfologia apresentada por essas células. Não foi possível detectar diferenças relacionadas à morfologia das células de queratinócitos HaCat aderidas nas diferentes membranas de CB e CB-Aloe.

Figura 17. Micrografias obtidas por MEV de membranas de CB (a), CB-G (b), CB-T (c) e CB-F (d) mostrando queratinócitos cultivados por 24 horas, aderidos à superfície das membranas.



Os resultados obtidos corroboram com os resultados de CHIAOPRAKOBKIJ e seus colaboradores (2011) que cultivaram por 48 horas HaCat sobre biomateriais de celulose bacteriana e compósitos de alginato (polissacarídeo natural). As HaCat apresentaram uma morfologia normal, com aderência e espalhamento destas células na

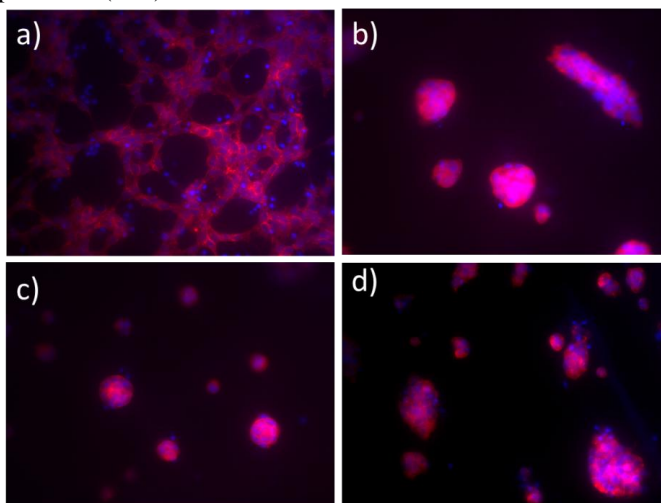
superfície da celulose bacteriana e dos compósitos de alginato, indicando uma interação biomaterial/célula mais evidente, sendo que foram identificadas poucas células em ambos os materiais.

A presença de regiões com precipitados brancos sugere resíduos de PBS, que foi a solução tampão salina utilizada no preparo das amostras.

Para evidenciar a morfologia das células HaCat cultivadas sobre as membranas CB e CB-Aloe, após sete dias de cultivo (Figura 18), foram corados os filamentos do citoesqueleto por faloidina (vermelho) e do núcleo por DAPI (azul).

A Figura 18 mostra a morfologia de queratinócitos cultivados sobre as membranas CB e CB-Aloe, onde nota-se que as células apresentam morfologia relativamente espraída, com citoesqueletos organizados e distribuídos ao longo da superfície da membrana de CB (a). Nas demais membranas CB-Aloe as células apresentam-se aglomeradas e pouco aderidas na superfície das membranas.

Figura 18. Morfologia de queratinócitos cultivados sobre as membranas (a) CB, (b) CB-G, (c) CB-T e (d) CB-F. Os filamentos de F-actina que compõem o citoesqueleto das células HaCat aparecem corados por faloidina (vermelho) e os núcleos por DAPI (azul).



A quantidade menor de células aderidas nas membranas pode ser interessante. Suportes com diferentes características adesivas podem

modular formatos celulares e funções teciduais em culturas celulares organizadas (GOTOH e TAMADA, 2005).

As HaCat menos aderidas sobre as membranas de CB-Aloe pode ter sofrido influência das diversas etapas de lavagem durante o procedimento de coloração das células, como relatado por GOTOH e TAMADA (2005) e PÉRTILE (2007). Também estes aglomerados celulares presentes nas CB-Aloe indicam formação de colônias de células diferenciadas (BARRANDON e GREEN, 1987; RODAS, 2004).

Os resultados indicam uma interação mais expressiva células/biomaterial entre os queratinócitos aderidos sobre as membranas CB, e uma interação intermediária sobre as membranas CB-Aloe. A interação célula/biomaterial foi investigada por BAČÁKOVÁ e colaboradores (2004). Esses pesquisadores identificaram diferenças na morfologia de adesão de célula, sendo que nas regiões de baixa interação célula/biomaterial, as células apresentaram morfologia arredondada sobre essas superfícies. Neste caso é importante ressaltar que fenotipicamente as células de queratinócitos são naturalmente mais arredondadas do que as células de fibroblastos e isso pode ser claramente visualizado nos resultados obtidos.

Estudos das interações célula/biomaterial foram realizados por (MICHAELIS *et al.*, 2012), os quais descrevem que a interação de células com diferentes biomateriais está relacionada com diferentes fatores tais como: cristalinidade, arranjos de rede de fibras poliméricas, propriedades de absorção, superfície de contato, corroborando que as propriedades físico-químicas dos biomateriais podem causar efeitos na adesão, na proliferação e na diferenciação celular (MÜLLER *et al.*, 2006).

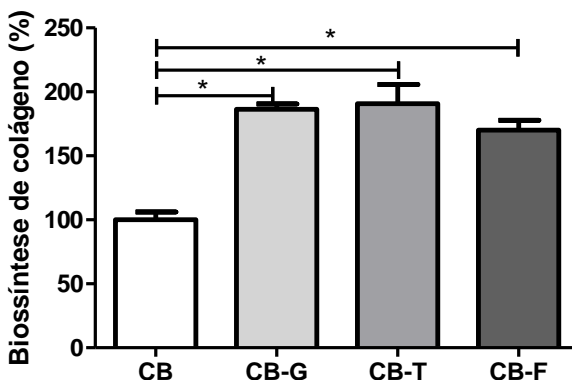
Considerando os resultados obtidos neste trabalho foi possível observar que as membranas de CB e CB-Aloe foram capazes de proporcionar a adesão das células de fibroblastos primários (HDFa) e queratinócitos (HaCat) na sua superfície. Além da adesão esses materiais proporcionaram a manutenção da viabilidade celular e um aumento do percentual de proliferação celular que parece ter sido ativado pela presença de *Aloe vera* nas membranas CB-Aloe. Além disso, a presença de *Aloe vera* incorporada à estrutura das membranas estimulou a produção de uma importante proteína da MEC, o colágeno o que pode proporcionar a sobrevivência de culturas e co-culturas celulares por longos períodos de experimentação *in vitro*.



#### 4.4.6 Biossíntese de colágeno pelos fibroblastos

Para avaliar a biossíntese de colágeno, proteína presente na matriz extracelular, fibroblastos primários (HDFa) foram cultivados sobre as membranas de CB e CB-Aloe por sete dias. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 19. Observa-se que a biossíntese de colágeno pelos fibroblastos cultivados sobre as membranas CB-Aloe, atinge níveis superiores àqueles encontrados para fibroblastos cultivados sobre as membranas controle, atingindo 90% nas membranas CB-T, 86% nas membranas CB-G e 70% nas CB-F.

Figura 19. Quantificação da biossíntese de colágeno por fibroblastos cultivados sobre membranas de CB e CB-Aloe. Dados normalizados em relação à CB controle. As barras representam o desvio padrão médios e \* representa as diferenças significância para  $p < 0,05$ .



O aumento da síntese de colágeno pelas células de fibroblastos cultivados sobre as membranas CB-Aloe sugere que essas membranas apresentam microestruturas e componentes que estimulam essa biossíntese. Esses componentes foram incorporados na CB pela adição das diferentes frações de *Aloe vera*. Essas frações possuem polissacarídeos, os quais estimulam a síntese de colágeno quando presentes no cultivo de fibroblastos.

De acordo com os dados obtidos por JETTANACHEAWCHANKIT e colaboradores (2009), que utilizaram uma solução contendo acemanana, composto presentes na *Aloe vera* estimulou a síntese de colágeno, após 48 horas de experimento; já os estudos *in vivo* realizados por CHITHRA e colaboradores (1998), avaliaram o processo de cicatrização de lesões dérmicas feitas em ratos,

utilizando membranas à base de colágeno contendo gel de *Aloe vera*. A avaliação realizada por análise histológica dessas lesões demonstrou a síntese de colágeno tipo I e tipo III, assim como a proliferação de fibroblastos e macrófagos nas áreas lesionadas, após aplicação das membranas. Sugerindo eficiência dessas membranas no processo de cicatrização.

Comprovando a produção de proteínas presentes na matriz extracelular, BOONYAGUL e colaboradores (2014) avaliaram a expressão de VEGF e a proliferação de células humanas estromais de medula óssea na presença de diferentes concentrações de acemanana, glucomanana presente na *Aloe vera*. Os resultados obtidos identificaram que a presença de acemanana estimulou a produção da expressão de VEGF e a proliferação celular. Eles observaram um perfil crescente na expressão de VEGF e da proliferação de células humanas estromais de medula óssea conforme o aumento da concentração de acemanana em solução. LEUNG e colaboradores (2004) identificaram que soluções com frações contendo polissacarídeos presentes na *Aloe vera* estimularam a secreção de interleucina (IL)-1 $\beta$  e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ .

## 5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos conclui-se que:

- ✓ A caracterização físico-química por FTIR foi ideal para identificar pequenas variações no espectro de absorção devido à presença de componentes da *Aloe vera* nas membranas compósitas;
- ✓ O aumento da massa seca nas membranas CB-T e CB-G foi mais expressivo, resultado compatível com a natureza das respectivas frações;
- ✓ A incorporação de frações de *Aloe vera* não estimulou a atividade metabólica dos fibroblastos (HDFa), quando cultivadas sobre as membranas de CB-Aloe;
- ✓ A topologia de todas as membranas CB-Aloe é similar à encontrada na CB pura;
- ✓ Os fibroblastos estão com morfologia espalhada apenas na CB e CB-F, sugerindo que componentes das frações Total e Gel não são favoráveis à manutenção da fisiologia esperada para esse tipo celular;
- ✓ Os queratinócitos estão espalhados nas membranas CB e CB-Aloe (Todas as membranas compósitas);
- ✓ O comportamento das células de fibroblastos e de queratinócitos são diferentes quando cultivadas sobre as membranas CB-G e CB-T;
- ✓ A biossíntese de colágeno de células de fibroblastos cultivadas sobre a superfície das membranas de CB-Aloe foi maior quando comparada com a CB pura, sugerindo que os componentes presentes nas diferentes frações de *Aloe vera* (babosa) estimulam a produção de componentes de matriz extracelular;
- ✓ O comportamento dos queratinócitos (HaCat) nas membranas de CB-Aloe foi diferente quando comparado com a CB, pois há um aumento da atividade metabólica e proliferação ao longo do tempo. Este é um comportamento que até então não foi reportado na literatura;
- ✓ Já o comportamento dos fibroblastos (HDFa), quando cultivados na CB-Aloe, manteve-se similar ao encontrado na CB, sendo que a proliferação das HDFa foi reduzida nos primeiros dias de cultura nas membranas de CB-Aloe;
- ✓ Em conjunto, os resultados e contribuições deste trabalho sugerem que: componentes presentes nas diversas frações de *Aloe vera* incorporados às membranas de celulose bacteriana estimulam a atividade metabólica de queratinócitos, a proliferação celular de

fibroblastos e queratinócitos, e a produção de colágeno tipo 1 por fibroblastos humanos.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Identificar e quantificar proteínas de matriz extracelular produzidas pelas células epiteliais quando cultivadas nas membranas CB e CB-Aloe;

- Realizar ensaios *in vivo* utilizando as membranas CB e CB-Aloe em lesões nos ratos, para avaliar o processo de cicatrização, bem como a formação de tecido no local lesionado;

- Acompanhar a evolução do transcriptoma de células epiteliais nos processos aqui estudados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, J.; STENHAMRE, H.; BÄCKDAHL, H. e GATENHOLM, P. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94 A, n. 4, p. 1124-1132. 2010.
- ATIBA, A.; NISHIMURA, M.; KAKINUMA, S.; HIRAOKA, T.; GORYO, M.; SHIMADA, Y.; UENO, H. e UZUKA, Y. *Aloe vera* oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor production. **American Journal Surgery**, v. 201, n. 6, p. 809-818. 2011.
- ATIBA, A.; UENO, H. e UZUKA, Y. The effect of *Aloe vera* oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. **Journal of Veterinary Medical**, v. 73, n. 5, p. 583-589. 2011.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials**, v. 28, n. 25, p. 3587-3593. 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M. e CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51. 2005.
- BARRANTON, Y. e GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 8, p. 2302-2306. 1987.
- BELAND, M. F. A. An Evaluation of the Biological and Toxicological Properties of *Aloe Barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. **Environmental Science and Health**, v.24:1, n. Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews, p. 103-154. 2006.
- BELL, E.; SHER, S.; HULL, B.; MERRILL, C.; ROSEN, S.; CHAMSON, A.; ASSELINEAU, D.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B.; LAPIERE, C.; NUSGENS, B. e NEVEUX, Y. The reconstitution of living skin. **Journal Investigative Dermatology**, v. 81, n. 1 Supp 1, p. 2 s-10 s. 1983.
- BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F. e PORTO, L. M. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4684-4691. 2013.
- BIONDI, M.; UNGARO, F.; QUAGLIA, F. e NETTI, P. A. Controlled drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 229-242. 2008.

BOWERS, S. L. K.; BANERJEE, I. e BAUDINO, T. A. The extracellular matrix: At the center of it all. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 474-482. 2010.

BOYCE, S. T. e WARDEN, G. D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. **American Journal Surgery**, v. 183, n. 4, p. 445-456. 2002.

BROWN, R. M., JR.; WILLISON, J. H. e RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 12, p. 4565-4569. 1976.

BUDAI, M. M.; VARGA, A.; MILESZ, S.; TÖZSÉR, J. e BENKŐ, S. *Aloe vera* downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 471-479. 2013.

BURKE, J. F.; YANNAS, I. V.; QUINBY, W. C. JR.; BONDOC, C. C. e JUNG, W. K. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of Surgery**, v. 194, n. 4, p. 413-428. 1981.

CHEN, P.; CHO, S. e JIN, H.-J. Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 4, p. 309-320. 2010.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B. e CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 36, n. 9, p. 896-901. 1998.

COLLA, G. Desenvolvimento de um reator biológico tecidual muscular a partir de vasos de celulose bacteriana. **Engenharia Química e Engenharia de Alimentos**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 76 p. 2014.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S. e BROWN, R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151. 2006.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M. e BROWN, R. M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12. 2006.

DAS, S.; MISHRA, B.; GILL, K.; ASHRAF, M. S.; SINGH, A. K.; SINHA, M.; SHARMA, S.; XESS, I.; DALAL, K.; SINGH, T. P. e DEY, S. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 38-43. 2011.

DAVIS, R. H.; DIDONATO, J. J.; JOHNSON, R. W. e STEWART, C. B. *Aloe vera*, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and anti-inflammation. **Journal American Podiatry Medical Association**, v. 84, n. 12, p. 614-621. 1994.

DÉLÉRIS, G. e PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, n. 1, p. 129-136. 2003.

DRURY, J. L. e MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351. 2003.

DUTTA, R. C. e DUTTA, A. K. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 334-339. 2009.

ESUA, M. F. e RAUWALD, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from *Aloe vera* gel: isolation, structure elucidation and *in vitro* bioassays. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 3, p. 355-364. 2006.

FAN, M.; DAI, D. e HUANG, B. Fourier transform infrared Spectroscopy for natural Fibres. **Fourier Transform–Materials Analysis. intech**. 2012.

FEDOROVICH, N. E.; ALBLAS, J.; DEWIJN, J. R.; HENNINK, W. E.; VERBOUT, A. J. e DHERT, W. J. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 8, p. 1905-1925. 2007.

FEMENIA, A.; SELVENDRAN, R. R.; RING, S. G. e ROBERTSON, J. A. Effects of heat treatment and dehydration on properties of cauliflower fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 728-732. 1999.

FU, L.; ZHANG, J. e YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442. 2013.

FU, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. e YANG, G. Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials. 2011.

GARCIA, S. J. F. AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO HIDROGEL DE QUITOSANA A 2% NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS. (Dissertação ). **Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia – FÁRMACO Medicamentos e Análises Clínicas.**, UFSC, Florianópolis - SC, 2011.

GARTNER, L. P. H. e JAMES L. Tratado de histologia em cores. Rio de Janeiro (RJ): **ELSEVIER**. 2007.

GECKIL, H.; XU, F.; ZHANG, X.; MOON, S. e DEMIRCI, U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. **Nanomedicine (Lond)**, v. 5, n. 3, p. 469-484. 2010.

GENTZKOW, G. D.; IWASAKI, S. D.; HERSHON, K. S.; MENGEL, M.; PRENDERGAST, J. J.; RICOTTA, J. J.; STEED, D. P. e LIPKIN, S. Use of dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. **Diabetes Care**, v. 19, n. 4, p. 350-354. 1996.

GEORGE, A. e RAVINDRAN, S. Protein templates in hard tissue engineering. **Nano Today**, v. 5, n. 4, p. 254-266. 2010.

GODINHO, J. Hidrogéis de Celulose Bacteriana Incorporados com Frações de *Aloe vera*. (Mestrado). **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2014.

GOTOH, Y. e TAMADA, Y. *In vitro* study of initial cell attachment to the surfaces coated with conjugates consisting of silk fibroin and chitooligosaccharides. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 74, n. 2, p. 39-45. 2005.

GRIFFITH, L. G. e NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1009-1014. 2002.

GRON, B.; STOLTZE, K.; ANDERSSON, A. e DABELSTEEN, E. Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. **APMIS**, v. 110, n. 12, p. 892-898. 2002.

HAFEMANN, B.; ENSSLEN, S.; ERDMANN, C.; NIEDBALLA, R.; ZUHLKE, A.; GHOFRANI, K. e KIRKPATRICK, C. J. Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis. **Burns**, v. 25, n. 5, p. 373-384. 1999.

HEGGERS, J. P.; KUCUKCELEBI, A.; LISTENGARTEN, D.; STABENAU, J.; KO, F.; BROEMELING, L. D.; ROBSON, M. C. e WINTERS, W. D. Beneficial effect of Aloe on wound healing in an excisional wound model. **Journal of Alternative Complementary Medicine**, v. 2, n. 2, p. 271-277. 1996.

HETTIARATCHY, S. e DZIEWULSKI, P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. **BMJ**, v. 328, n. 7453, p. 1427-1429. 2004.

HUTTER, J. A.; SALMAN, M.; STAVINOHA, W. B.; SATSANGI, N.; WILLIAMS, R. F.; STREEPER, R. T. e WEINTRAUB, S. T. Antiinflammatory C-Glucosyl Chromone from *Aloe barbadensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 5, p. 541-543. 1996.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S. e BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270. 2000.



JEONG, S.; LEE, S.; YANG, H.; JIN, Y. H.; PARK, C. S. e PARK, Y. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 6, n. 4, p. 370-377. 2010.

JETTANACHEAWCHANKIT, S.; SASITHANASATE, S.; SANGVANICH, P.; BANLUNARA, W. e THUNYAKITPISAL, P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, n. 4, p. 525-531. 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U. C. Histologia basica: [texto, atlas]. . Rio de Janeiro (RJ): **Guanabara Koogan**. 2008.

KAČURÁKOVÁ, M.; SMITH, A. C.; GIDLEY, M. J. e WILSON, R. H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 12, p. 1145-1153. 2002.

KANG, M. C.; KIM, S. Y.; KIM, Y. T.; KIM, E. A.; LEE, S.-H.; KO, S. C.; WIJESINGHE, W. A. J. P.; SAMARAKOON, K. W.; KIM, Y. S.; CHO, J. H.; JANG, H. S. e JEON, Y. J. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of polysaccharide purified from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*) gel. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, n. 1, p. 365-371. 2014.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal Dermatology**, v. 12, n. 4, p. 390-399; quiz 400-391. 2002.

KIM, S.-S.; GWAK, S.-J.; CHOI, C. Y. e KIM, B.-S. Skin regeneration using keratinocytes and dermal fibroblasts cultured on biodegradable microspherical polymer scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 75 B, n. 2, p. 369-377. 2005.

KLEIN, A. D. e PENNEYS, N. S. *Aloe vera*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 18, n. 4 Pt 1, p. 714-720. 1988.

KLEINMAN, H. K.; MCGARVEY, M. L.; HASSELL, J. R.; STAR, V. L.; CANNON, F. B.; LAURIE, G. W. e MARTIN, G. R. Basement membrane complexes with biological activity. **Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 312-318. 1986.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D. e DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie International Edition** v. 50, n. 24, p. 5438-5466. 2011.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U. e MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603. 2001.

KOIDE, M.; OSAKI, K.; KONISHI, J.; OYAMADA, K.; KATAKURA, T.; TAKAHASHI, A. e YOSHIKATO, K. A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 27, n. 1, p. 79-87. 1993.

LANGER, R. e VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926. 1993.

LANZA, R. L. A. J. V. Principles of Tissue Engineering **Academic Press**. 2007.

LEE, D. Y.; LEE, J. H.; YANG, J. M.; LEE, E. S.; PARK, K. H. e MUN, G. H. A new dermal equivalent: the use of dermal fibroblast culture alone without exogenous materials. **Journal Dermatology Science**, v. 43, n. 2, p. 95-104. 2006.

LEVIN, M. P.; TSAKNIS, P. J. e CUTRIGHT, D. E. Healing of the Oral Mucosa with the Use of Collagen Artificial Skin\*. **Journal of Periodontology**, v. 50, n. 5, p. 250-253. 1979.

LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H.-J.; YU, C. M. e HSU, S. H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603-611. 2013.

LORENZ, C.; PETRACIC, A.; HOHL, H. P.; WESSEL, L. e WAAG, K. L. Early wound closure and early reconstruction. Experience with a dermal substitute in a child with 60 per cent surface area burn. **Burns**, v. 23, n. 6, p. 505-508. 1997.

LUO, H.; ZHANG, J.; XIONG, G. e WAN, Y. Evolution of morphology of bacterial cellulose scaffolds during early culture. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, n. 1, p. 722-728. 2014.

MCANALLEY, B. H. C. e MCDANIEL, H. R. Wound healing accelerated by systemic administration of polysaccharide from *Aloe vera*. **United States Patent**, p. Patent number 5, 468, 737. 1995.

MEVES, A.; STOCK, S. N.; BEYERLE, A.; PITTELKOW, M. R. e PEUS, D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. **Toxicology Letter**, v. 122, n. 3, p. 205-214. 2001.

MICHAELIS, S.; ROBELEK, R. e WEGENER, J. Studying cell-surface interactions *in vitro*: a survey of experimental approaches and techniques. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 126, p. 33-66. 2012.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S. e UR REHMAN, D. I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179. 2008.

MÜLLER, F. A.; MÜLLER, L.; HOFMANN, I.; GREIL, P.; WENZEL, M. M. e STAUDENMAIER, R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 21, p. 3955-3963. 2006.

PALSSON, S. N. B. E. B. Ø. Tissue Engineering: Prentice Hall. New Jersey. 2004.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G. e STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 839-845. 2007.

PENG, S. Y.; NORMAN, J.; CURTIN, G.; CORRIER, D.; MCDANIEL, H. R. e BUSBEE, D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. **Molecular Biotherm**, v. 3, n. 2, p. 79-87. 1991.

PÉREZ, R. A.; WON, J. E.; KNOWLES, J. C. e KIM, H. W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 1. 2013.

PETERSEN, N. e GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Application Microbiol Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277-1286. 2011.

PÉRTILE, R. A. N. Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos. (Mestrado). **Universidade Federal de Santa Catarina**, 75 p. 2007.

PRIYA, S. G.; JUNGVID, H. e KUMAR, A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. **Tissue Engineering Part B Revision**, v. 14, n. 1, p. 105-118. 2008.

PURNA, S. K. e BABU, M. Collagen based dressings--a review. **Burns**, v. 26, n. 1, p. 54-62. 2000.

RAMACHANDRA, C. T. e RAO, P. S. Processing of *Aloe vera* Leaf Gel: A Review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 502-510. 2008.

RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTÔNIO, R. V. e PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 549-554. 2008.

RAY, A. e ASWATHA, S. M. An analysis of the influence of growth periods on physical appearance, and acemannan and elemental distribution of *Aloe vera* L. gel. **Industrial Crops and Products**, v. 48, n. 1, p. 36-42. 2013.

RECOUVREUX, D. O. S. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. (Tese). **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**, UFSC, Florianópolis, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. ; RAMBO, C. R. ; BERTI, F. V. ; CARMINATTI, C. A. ; ANTÔNIO, R. V. e PORTO, L. M. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 151-157. 2011.

REKUS, M. T. Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system. **Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf**. 91 p. 2000.

RODAS, A. C. D. Desenvolvimento de membranas como composto dermo epidérmico. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ROSS, P.; MAYER, R. e BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35-58. 1991.

SAIBUATONG, O. A. e PHISALAPHONG, M. Novo *Aloe vera*-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455-460. 2010.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P. e PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Program**, v. 22, n. 4, p. 1194-1199. 2006.

SAXENA, I. M. e BROWN, R. M. Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 9-21. 2005.

SAYAG, J.; MEAUME, S. e BOHBOT, S. Healing properties of calcium alginate dressings. **Journal Wound Care**, v. 5, n. 8, p. 357-362. 1996.

SCHAFER, I. A.; KOVACH, M.; PRICE, R. L. e FRATIANNE, R. B. Human keratinocytes cultured on collagen gels form an epidermis which synthesizes bullous pemphigoid antigens and  $\alpha 2 \beta 1$  integrins and secretes laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan at the basal cell surface. **Experimental Cell Research**, v. 195, n. 2, p. 443-457. 1991.

SCHOOP, V. M.; MIRANCEA, N. e FUSENIG, N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **Journal Investigation Dermatology**, v. 112, n. 3, p. 343-353. 1999.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQUIERDO, I. e PORTOLES, M. T. *In vitro* biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5603-5611. 2004.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L. e JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258. 2010.

SHI, Q. ; LI, Y.; SUN, J.; ZHANG, H.; CHEN, L.; CHEN, B.; YANG, H. e WANG, Z. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2. **Biomaterials**, v. 33, n. 28, p. 6644-6649. 2012.

SILVA, S. S.; OLIVEIRA, M. B.; MANO, J. F. e REIS, R. L. Bio-inspired *Aloe vera* sponges for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, n. 1, p. 264-270. 2014.

SINGER, A. J. e CLARK, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746. 1999.

SIRÓ, I. e PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 459-494. 2010.

SOUTO, L. R.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. e PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Medicinal Journal**, v. 124, n. 2, p. 71-76. 2006.

SOUTO, L. R.; VASSALLO, J.; REHDER, J.; PINTO, G. A. e PUZZI, M. B. Immunoarchitectural characterization of a human skin model reconstructed *in vitro*. **Sao Paulo Medicinal Journal**, v. 127, n. 1, p. 28-33. 2009.

STOCK, U. A. e VACANTI, J. P. Tissue engineering: current state and prospects. **Annual Review Medicine**, v. 52, p. 443-451. 2001.

STOPAK, D. e HARRIS, A. K. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction: I. Tissue culture observations. **Developmental Biology**, v. 90, n. 2, p. 383-398. 1982.

STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R. e PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4739-4745. 2013.

SURJUSHE, A. ; VASANI, R. e SAPLE, D. G. *Aloe vera*: a short review. **Indian Journal Dermatology**, v.53, n.4, p.163-166. 2008.

TAKAKURA, I.; YABE, M.; KATO, Y.; MATSUMOTO, M.; YABE, H.; INOKUCHI, S.; KIDOKORO, M.; SHIMAMURA, K. e KATO, S. An *in vivo* model of human skin acute graft-versus-host disease: transplantation of cultured human epidermal cells and dermal fibroblasts with human lymphocytes into SCID mice. **Experimental Hematology** **1**, v. 27, n. 12, p. 1815-1821. 1999.

TIBBITT, M. W. e ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655-663. 2009.

TOMASEK, J. J. e HAY, E. D. Analysis of the role of microfilaments and microtubules in acquisition of bipolarity and elongation of fibroblasts in hydrated collagen gels. **Journal Cell Biology**, v. 99, n. 2, p. 536-549. 1984.

VALE, E. C. S. D. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 9-19. 2005.

VOGLER, B. K. e ERNST, E. *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectiveness. **British Journal General Practice**, v. 49, n. 447, p. 823-828. 1999.

VOIGT, M.; SCHAUER, M.; SCHAEFER, D. J.; ANDREE, C.; HORCH, R. e STARK, G. B. Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds. **Tissue Engineering**, v. 5, n. 6, p. 563-572. 1999.

WALDER, A. I.; MAY, P. D.; BINGHAM, C. P. e WRIGHT, J. R. Evaluation of synthetic films as wound covers. **Transactions-American Society Artificial Internal Organs**, v. 15, p. 29-32. 1969.

WANG, T. W.; HUANG, Y. C.; SUN, J. S. e LIN, F. H. Organotypic keratinocyte-fibroblast cocultures on a bilayer gelatin scaffold as a model of skin equivalent. **Biomed Sciences Instrumentation**, v. 39, p. 523-528. 2003.

WANG, J. Y. Y.; SHI, Y. I.; CONG, D. L. I.; CHEN, Y. Y. Research on Characterization and Biocompatibility of Nano-bacterial Cellulose Membrane. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 30, n. 8, p. 1553-1558. 2009.

WATANABE, A.; MORITA, S. e OZAKI, Y. Study on temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose Ibeta by infrared spectroscopy with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3164-3170. 2006.

WATANABE, A.; MORITA, S. e OZAKI, Y. Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose Ialpha studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose Ibeta. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 9, p. 2969-2975. 2007.

WITTAYA, S. e PRAHSARN, C. Development and *in vitro* evaluation of chitosan–polysaccharides composite wound dressings. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, n. 1–2, p. 123-128. 2006.

YAO, H.; CHEN, Y.; LI, S.; HUANG, L.; CHEN, W. e LIN, X. Promotion proliferation effect of a polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller on human fibroblasts *in vitro*. **Internation Journal Biological Macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 152-156. 2009.

YANG, X.; ZHAO, K.; CHEN, G. Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v. 23, n. 5, p. 1391-7. 2002.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. e SEIFALIAN, A. M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. **Trends Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 638-648. 2012.

ZAULYANOV, R. S. K. E. L. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. **Clinical Interventions in Aging** v. 2 (1) p. 93-98. 2007.

ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z. e LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 2, n. 5, p. 510-525. 2010.